



**Tipificación multilocus (MLST) de aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina
(MRSA) provenientes de infecciones sistémicas en dos hospitales de Quito**

Andrade Nicolalde Doménica Sofía

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Grijalva Silva, Rodrigo Marcelo M. D. PhD.

20 de enero del 2021



Proyecto de Grado_COPYLEAKS Domenica Andrade.docx

Scanned on: 13:49 January 24, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	402
Words with Minor Changes	53
Paraphrased Words	228
Ommited Words	0



Escanea el QR adjunto para:
RODRIGO MARCELO
GRIJALVA SILVA



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, denominado “**Tipificación multilocus (MLST) de aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) provenientes de infecciones sistémicas en dos hospitales de Quito**” fue realizado por la señorita **Andrade Nicolalde, Doménica Sofía** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 20 de enero del 2022

Firma:



Firma digitalizada por:
RODRIGO MARCELO
GRIJALVA SILVA

Dr. Grijalva Silva, Rodrigo Marcelo M.D., PhD.

C.C.: 1706590641



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Andrade Nicolalde, Doménica Sofía**, con C.C. 1726181504, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Tipificación multilocus (MLST) de aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) provenientes de infecciones sistémicas en dos hospitales de Quito”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 20 de enero del 2022

Firma:

A handwritten signature in blue ink, reading 'Doménica Sofía', is written over a horizontal dotted line.

Andrade Nicolalde, Doménica Sofía

C.C. 1726181504



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, **Andrade Nicolalde, Doménica Sofía**, con C.C. 1726181504, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Tipificación multilocus (MLST) de aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA) provenientes de infecciones sistémicas en dos hospitales de Quito”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad

Sangolquí, 20 de enero del 2022

Firma:

A handwritten signature in blue ink, reading 'Doménica Sofía', is written over a horizontal dotted line. The signature is cursive and includes a long horizontal stroke that extends to the left and loops back under the name.

Andrade Nicolalde, Doménica Sofía

C.C. 1726181504

Dedicatoria

Dedicado a mis padres Nancy Nicolalde, Fausto Andrade y a mi abuelita María Dolores Cifuentes. Son mi mayor ejemplo a seguir, este trabajo es reflejo de su amor, apoyo y soporte incondicional. Cada logro en mi vida será siempre de ustedes.

Agradecimientos

A mis padres, Nancy y Fausto. Por su apoyo he podido culminar esta etapa de mi preparación académica. Agradezco su paciencia, confianza, sacrificio y esfuerzo; son los pilares que, basados en valores, han logrado forjar la profesional en la que me he convertido.

A toda mi familia por su incondicional amor, en especial a Gabriela y Josette, mis hermanas.

Al Dr. Marcelo Grijalva por brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto en su laboratorio y ser guía en mi preparación profesional.

A los docentes Blanca Naranjo, María Emilia Medina, Thelvia Ramos, René Escobar, Lucía Jiménez, Mónica Jadán y Marbel Torres por ser parte importante de mi desarrollo no solo académico sino también humano.

A Michelle Paredes, Kirsty Noboa, Judith Torres, Dayana Aguilar y al Dr. Francisco Flores, quienes han guiado mi trabajo en diversas instancias y ante cualquier inquietud han estado presentes.

A Tatiana Lara, quien fuera de apoyar este trabajo, se ha convertido en una buena amiga, mi proveedora de dulces y compañera en buenos y malos momentos.

A José Carlos, mi motivación para seguir adelante, por su apoyo, ayuda, paciencia y amor. Te agradezco el solo hecho de ser parte de mi vida, te amo para siempre.

A mis amigos, Lenin, Denisse, Alfredo, Brandon, Alejandra, Camila, Michelle, Gisell, Nicole y Wilmer. Por todo lo vivido, saben que son mi familia. Espero cumplan todos sus sueños, cuenten con una amistad sincera en cada paso del camino.

Al hijo de mi corazón, Percy Oswaldo Drogon Targaryen. Mi compañero más fiel, te adoro pequeño.

Índice de Contenidos

Certificación Copyleaks	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de Contenidos	8
Índice de Tablas	12
Índice de Figuras	13
Abreviaturas	15
Resumen	18
Abstract	19
Capítulo I: Introducción	20
Antecedentes	20
Justificación	22
Objetivos del Proyecto de Grado	23
Objetivo General	23
Objetivos Específicos	24

Capítulo II: Revisión Bibliográfica	25
Generalidades	25
Clasificación y Taxonomía	26
Morfología	26
Epidemiología	27
Genoma.....	29
Factores de Virulencia.....	32
Tipificación molecular de <i>Staphylococcus aureus</i>	34
Secuenciación del Gen Codificante de la Proteína A (Spa Typing)	35
Análisis de Polimorfismo de Locus Múltiples con Número Variable de Repeticiones en Tándem (MLVA)	35
Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)	36
Secuenciación Multilocus (MLST)	36
Capítulo III: Metodología	38
Participantes	38
Zona de Estudio.....	38
Periodo de Investigación.....	38
Recuperación de Aislados Clínicos.....	38
Caracterización Molecular	39
Extracción manual de DNA	39
Electroforesis	40

	10
Cuantificación de DNA	41
PCR multiplex para la caracterización de los aislados	41
Secuenciación de genes metabólicos	41
PCR para amplificación de genes metabólicos	41
Purificación de productos de PCR de genes metabólicos.....	43
Reacción de secuenciación cíclica.....	44
Purificación de productos de PCR de secuencia	45
Secuenciación Sanger	45
Análisis Bioinformático	46
Curación de secuencias.....	46
Identificación de números alélicos y secuencias tipo	46
Análisis de frecuencia alélica y de secuencias tipo	46
Análisis filogenético	47
Capítulo IV: Resultados.....	48
Recuperación de Aislados Clínicos.....	48
Extracción de DNA	48
Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes	50
PCR de genes metabólicos o housekeeping	51
Secuenciación Sanger	54
Identificación de números alélicos y secuencias tipo	57

	11
Análisis filogenéticos.....	60
Capítulo V: Discusión	71
Capítulo VI: Conclusiones y Recomendaciones	79
Bibliografía	81
Anexos	92

Índice de Tablas

Tabla 1.	<i>Taxonomía de Staphylococcus aureus</i>	26
Tabla 2.	<i>Estructura genética de los diferentes cassettes cromosomales de S. aureus</i>	31
Tabla 3.	<i>Factores de virulencia de MRSA</i>	32
Tabla 4.	<i>Primers requeridos para 7 genes housekeeping de MRSA</i>	37
Tabla 5.	<i>Componentes de la PCR para amplificación de genes arcC, gmk, pta, glpF, tpiA, yqi ...</i>	41
Tabla 6.	<i>Componentes para la PCR para amplificación del gen aroE</i>	42
Tabla 7.	<i>Programa PCR para amplificación de genes metabólicos usando GoTaq Polymerase</i>	43
Tabla 8.	<i>Componentes para la reacción de secuenciación</i>	44
Tabla 9.	<i>Programa PCR para reacción de secuenciación utilizando BigDye™ Terminator v3.1</i> <i>Cycle Sequencing</i>	45
Tabla 10.	<i>Valores de cuantificación obtenidos luego de la extracción de DNA</i>	49
Tabla 11.	<i>Resultados de PCR multiplex</i>	50
Tabla 12.	<i>Perfiles alélicos obtenidos para los 26 aislados analizados</i>	57
Tabla 13.	<i>Frecuencias de números alélicos obtenidos</i>	58
Tabla 14.	<i>Frecuencia de secuencias tipo obtenidas</i>	60

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Resistencia a oxacilina y cefoxitin por resistencia a meticilina en S. aureus hospitalarios.....</i>	21
Figura 2. <i>Staphylococcus aureus meticilino resistentes en microscopio electrónico de barrido.</i>	27
Figura 3. <i>Prevalencia de MRSA a nivel mundial</i>	28
Figura 4. <i>Elementos genómicos mayoritarios en MRSA.....</i>	30
Figura 5. <i>Análisis bioquímico de las muestra B6</i>	48
Figura 6. <i>Identificación molecular de MRSA</i>	50
Figura 7. <i>Amplicones obtenidos para gen arcC.....</i>	51
Figura 8. <i>Amplicones obtenidos para gen aroE.....</i>	51
Figura 9. <i>Amplicones obtenidos para gen glpF</i>	52
Figura 10. <i>Amplicones obtenidos para gen gmk.....</i>	52
Figura 11. <i>Amplicones obtenidos para gen pta</i>	53
Figura 12. <i>Amplicones obtenidos para gen tpiA</i>	53
Figura 13. <i>Amplicones obtenidos para gen yqiL</i>	53
Figura 14. <i>Secuencia obtenida para el gen yqiL de la muestra X10 y sus valores de calidad</i>	54
Figura 15. <i>Electroferograma de porción del gen yqiL de la muestra X10</i>	54
Figura 16. <i>Variante alélica con mutación puntual en nucleótido 173 del gen aroE en muestra X8</i>	55
Figura 17. <i>Traducción de mutación en gen aroE de muestra X8 comparada con alelo de referencia 974</i>	56
Figura 18. <i>Variante alélica con mutación puntual en el nucleótido 326 del gen pta en la muestra R1</i>	56

Figura 19. Traducción de mutación en gen <i>pta</i> de muestra R1 comparada con alelo de referencia 678	56
Figura 20. Variante alélica con mutación puntual en el nucleótido 500 del gen <i>pta</i> en muestra A18	56
Figura 21. Traducción de mutación en gen <i>pta</i> de muestra A18 comparada con alelo de referencia 4	57
Figura 22. Árbol filogenético para gen <i>arcC</i>	61
Figura 23. Árbol filogenético para gen <i>aroE</i>	62
Figura 24. Árbol filogenético para gen <i>glpF</i>	63
Figura 25. Árbol filogenético para gen <i>gmk</i>	64
Figura 26. Árbol filogenético para gen <i>pta</i>	65
Figura 27. Árbol filogenético para gen <i>tpiA</i>	66
Figura 28. Árbol filogenético para gen <i>yqiL</i>	67
Figura 29. Árbol filogenético de secuencias concatenadas	68
Figura 30. Árbol de mínima expansión de los 26 aislados de MRSA estudiados	69
Figura 31. Árbol de mínima expansión de los 26 aislados de MRSA estudiados incluyendo clones previamente reportados en América del Sur	70

Abreviaturas

16S	Gen del componente de la subunidad menor del ribosoma bacteriano
°C	Grados centígrados
A	Adenina
<i>arcC</i>	Carbamato quinasa
<i>aroE</i>	Shikimato deshidrogenasa
BHI	Infusión Cerebro-Corazón (Siglas en inglés)
C	Citosina
CA MRSA	Staphylococcus aureus comunitario (Siglas en inglés)
CHIPS	Proteína inhibidora de la quimiotaxis (Siglas en inglés)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Siglas en inglés)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (Siglas en inglés)
ETs	Toxinas exfoliativas (Siglas en inglés)
G	Guanina
<i>glpF</i>	Glicerol quinasa
<i>gmk</i>	Guanilato quinasa
HA MRSA	Staphylococcus aureus hospitalario (Siglas en inglés)
HCAM	Hospital Carlos Andrade Marín

HEE	Hospital de Especialidades Eugenio Espejo
MRSA	<i>S. aureus</i> resistentes a Meticilina (Siglas en inglés)
MSSA	<i>S. aureus</i> susceptibles a Meticilina (Siglas en inglés)
MSTree	Árbol de mínima expansión (Siglas en inglés)
MLST	Tipificación Multilocus de Secuencias (Siglas en inglés)
MLT	Árbol de máxima verosimilitud (Siglas en inglés)
MLVA	Análisis Multilocus de Repetición en Tándem de Número Variable (Siglas en inglés)
min	Minuto
mM	Milimolar
mm	Milímetro
ND	No Determinada
ng	Nanogramo
ORF	Marco de lectura abierto (Siglas en inglés)
PBP2a	Proteína de unión alternativa a Penicilina (Siglas en inglés)
PBPs	Proteínas de unión a Penicilina (Siglas en inglés)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Siglas en inglés)
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsado (Siglas en inglés)

PubMLST	Bases de datos públicas para tipificación molecular y diversidad del genoma microbiano (Siglas en inglés)
<i>pta</i>	Fosfato acetiltransferasa
PVL	Leucocidina de Panton-Valentine (Siglas en inglés)
rpm	Revoluciones por minuto
<i>SCC mec</i>	Cassette cromosómico estafilocócico <i>mec</i> (Siglas en inglés)
SSRs	Secuencias cortas repetidas (Siglas en inglés)
ST	Secuencia tipo (Siglas en inglés)
T	Timina
<i>tpiA</i>	Triosafofosfato isomerasa
TSA	Agar de soya triptona (Siglas en inglés)
TSST	Toxina del síndrome de choque tóxico (Siglas en inglés)
μL	Microlitro
μM	Micromolar
U/ μL	Unidades por microlitro
VNTRs	Repetición en Tándem de Número Variable (Siglas en inglés)
v/w	Porcentaje volumen peso
<i>yqiL</i>	Acetil coenzima A acetiltransferasa

Resumen

Las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente son al momento una preocupación clínica y epidemiológica. Este patógeno se ha relacionado comúnmente con infecciones intrahospitalarias, sin embargo, existen variantes comunitarias de alta infectividad especialmente peligrosas por sus diversos factores de virulencia. Gracias a las vastas herramientas bioinformáticas y la cantidad de documentación existente, es posible estudiar las relaciones evolutivas y la variabilidad genética de estas bacterias. En esta investigación se analizaron mediante tipificación multilocus de secuencias (MLST), 26 aislados clínicos procedentes de hemocultivos de dos hospitales de referencia de Ecuador. Se estandarizaron y optimizaron ensayos de PCR end point para los genes constitutivos incluidos en el esquema MLST, para la reacción de secuenciación cíclica, y para los procedimientos de purificación necesarios. Las variantes alélicas de las muestras y sus secuencias tipo se analizaron empleando la base de datos PubMLST, obteniendo 8 secuencias tipo no determinadas (ND) previamente y tres alelos con mutaciones puntuales. Se realizaron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud (MLT) para cada gen constitutivo y para las secuencias concatenadas además de árboles de mínima expansión (MSTree). El análisis de estos datos permitió determinar que no existe relación entre las muestras estudiadas y los clones reportados previamente en el país y en territorios aledaños, demostrando la aparición de nuevas variantes en Ecuador, información esencial para el monitoreo epidemiológico y clínico de este tipo de infecciones.

Palabras Clave:

- **STAPHYLOCOCCUS AUREUS**
- **RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS**
- **TIPIFICACIÓN MULTILOCUS DE SECUENCIA**

Abstract

Staphylococcus aureus methicillin resistant-associated infections are currently a clinical and epidemiological concern. This opportunistic pathogen has been commonly associated with hospital infections; however, community variants of high infectivity have recently appeared and have raised concerns due to their various virulence factors. Thanks to the available bioinformatic tools and the amount of genetic data currently in accessible databases, it is possible to study the evolutionary relationships and genetic variability of these bacteria. In this research, 26 clinical isolates from blood cultures belonging to patients from two reference hospitals in Ecuador, were analyzed using multilocus sequence typing (MLST). PCR assays were standardized and optimized for both constitutive MLST genes, and for the cyclic sequencing reaction required in the Sanger sequencing method, along with the necessary purification procedures. Allelic variants of the samples and their sequence type were analyzed using the PubMLST database. Eight, previously undetermined type sequences (ND) were obtained along with three alleles with point mutations. Maximum Likelihood Phylogenetic Trees (MLT) were performed for each constitutive gene and for the concatenated sequences, minimum expansion trees (MSTree) were also included. The analysis of these data showed no phylogenetic associations for the samples studied and the clones previously reported in the country and in surrounding territories, demonstrating the emergence of new variants in Ecuador. The present study may contribute to timely clinical and epidemiological surveillance of MRSA infections at a local level.

Key Words:

- **STAPHYLOCOCCUS AUREUS**
- **ANTIBIOTIC RESISTANCE**
- **MULTILOCUS SEQUENCE TYPING**

Capítulo I: Introducción

Antecedentes

El ser humano se ha enfrentado a la virulencia de *Staphylococcus aureus* desde hace más de un siglo, específicamente en 1880 la bacteria fue inicialmente identificada por el médico Alexander Ogston en el fluido proveniente de un absceso y en 1884 fue formalmente aislada por Friederich Rosenbach (Turner et al., 2019).

Durante la segunda guerra mundial se concreta el primer tratamiento frente a *S. aureus* gracias a Alexander Fleming quien descubrió la penicilina. Este es un antibiótico con la capacidad de interferir en el ensamblaje de la pared celular lo que deja al microorganismo vulnerable ante alteraciones osmóticas provocando su muerte, con su uso se logró reducir el número de decesos por neumonía y meningitis. No obstante, para 1945 el 80% de aislados clínicos presentaban resistencia al fármaco (Lakhundi & Zhang, 2018).

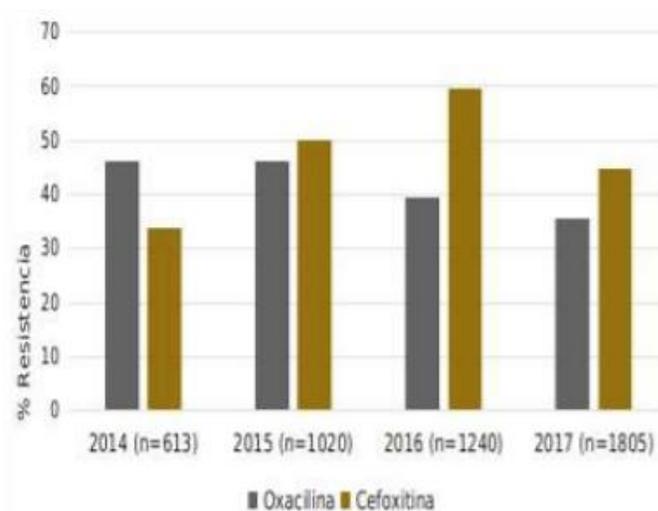
En 1950 se produce una epidemia con una duración de diez años, en Australia, Reino Unido, Estados Unidos y Canadá. Se presentó con infecciones cutáneas severas, sepsis y neumonía. Para su erradicación en 1959 sale al mercado la metilina, un fármaco semisintético al que *S. aureus* hizo frente incorporando en su cromosoma el gen *mecA*, mismo que codifica una proteína de unión alternativa a penicilina (PBP2a) con afinidad reducida por los medicamentos como metilina, oxacilina, nafcilina y agentes cefepínicos, observándose así, en 1961 en Inglaterra las primeras cepas de *S. aureus* metilino resistentes (MRSA) (Katayama et al., 2000; Lakhundi & Zhang, 2018).

Dichos sucesos anticiparon a la comunidad científica sobre la propagación de *S. aureus* MRSA hospitalario hacia la comunidad, pero no de la generación, en la comunidad, de cepas genéticamente distintas a las hospitalarias causantes de brotes en las décadas siguientes

(Deresinski, 2005). En 1980 y 1990 la bacteria resistente vuelve a manifestarse generando complicaciones clínicas en Reino Unido, Australia, Irlanda, Estados Unidos y en el Lejano Oriente (Gould & Chamberlaine, 1995).

Figura 1

Resistencia a oxacilina y cefoxitin por resistencia a meticilina en S. aureus hospitalarios



Nota. El gráfico representa el porcentaje de resistencia a oxalicina y cefoxitin de *Staphylococcus aureus* hospitalarios en Ecuador desde 2014 hasta 2017. Tomado de *Resistencia a oxacilina y cefoxitin por resistencia a meticilina en S. aureus hospitalario* (p. 9), Adaptado de Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, 2019. Ministerio de Salud Pública.

En América del Sur, los primeros registros de MRSA surgieron en 2003 en Brasil y Uruguay, a partir de la fecha se han realizado varios estudios que apuntan a la presencia de aislados de este tipo con una prevalencia del 47% en la región y del 28% a nivel nacional. Los estudios además señalan que las cepas de tipo comunitario son predominantes en Ecuador (Barrios López et al., 2012; Reyes et al., 2009). En Quito, en el Hospital Carlos Andrade Marín, se

documentó durante 2007 y 2008 un brote de *S. aureus* en la unidad de cuidados intensivos, donde de 17 cepas analizadas, 8 fueron resistentes a metilina (Cardenas et al., 2013).

El informe realizado por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (2019), tomó en cuenta los reportes realizados, desde 2014, por 44 entidades de salud inscritas en el programa de vigilancia de organismos resistentes a antimicrobianos, liderado por la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. En la Figura 1 se puede visualizar que en cuanto a las opciones terapéuticas para MRSA, cefoxitina y oxacilina, durante el periodo de estudio, se generó un aumento en la resistencia del 33% al 59% y una disminución de la resistencia del 46% al 35%, respectivamente.

Justificación

A nivel global existe una creciente preocupación por la falta de estrategias para el tratamiento de enfermedades infecciosas y por el manejo inadecuado de antimicrobianos, hecho precursor de cepas resistentes. Dentro de esta problemática la Organización Mundial de la Salud (2020), ha calificado a *S. aureus* metilino resistente como uno de los microorganismos de prioridad elevada, incluyendo en su informe que la probabilidad de deceso en pacientes portadores de estas cepas comparado con aquellos infectados por cepas no resistentes es 64% mayor.

Por años, el método de tipificación molecular más utilizado con el fin de detectar MRSA ha sido la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), sin embargo, esta técnica ofrece resultados que no son fácilmente interpretados o comparados de forma adecuada y por su bajo rendimiento, no es sugerido para investigaciones epidemiológicas a largo plazo. Por otra parte, en el análisis genético de muestras, PFGE, determina arbitrariamente la distancia de enlace entre las muestras y además supone que las bandas de igual tamaño son idénticas (Blanc et al.,

2002; Nemoy et al., 2005). Por su parte, el método de tipificación denominado MLST (Multi-Locus Sequence Typing) brinda resultados de fácil reproducibilidad e interpretación, además, de cantidades significativas de datos genéticos que permiten establecer modelos sofisticados de evolución y epidemiología (Alberto Díaz-Sánchez et al., 2018; Pérez-Losada et al., 2017).

En Ecuador, existe un número limitado de investigaciones relacionadas con la evolución, epidemiología y virulencia de MRSA a pesar de que otros países como España señalan a los pacientes ecuatorianos como un grupo de riesgo por la alta prevalencia del patógeno en sus investigaciones (31% en niños) (Barrios López et al., 2012). Un estudio sobre la cantidad de portadores nasales de MRSA en un Hospital de Especialidades en Quito, concluye que, a pesar de tener una baja prevalencia en el personal del centro médico, el porcentaje existente (12.5%), es alarmante sobre todo porque se presenta en la zona de cuidados intensivos y porque este tipo de colonización es un precedente de infecciones nosocomiales (Vaca et al., 2021).

El presente estudio determinará la estructura poblacional de MRSA mediante tipificación MLST y las relaciones filogenéticas necesarias para establecer medidas de prevención y vigilancia del patógeno, lo que será valioso para la comunidad científica y médica, pues constituye una herramienta que sienta las bases para futuras investigaciones en el país y permite instituir estrategias de control y tratamiento específicas para nuestra población.

Objetivos del Proyecto de Grado

Objetivo General

- Tipificar los aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) provenientes de infecciones sistémicas en dos hospitales de Quito mediante el análisis de secuencias multilocus (MLST).

Objetivos Específicos

- Estandarizar el sistema de MLST para la tipificación de aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina provenientes de infecciones sistémicas en el Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM) y del Hospital de Especialidades Eugenio Espejo (HEE).
- Definir la distribución de los genotipos presentes en los aislados en estudio.
- Establecer mediante sistemas bioinformáticos las relaciones clonales entre cepas de *S. aureus* analizadas.

Capítulo II: Revisión Bibliográfica

Generalidades

Staphylococcus aureus meticilino resistente es un patógeno oportunista con la capacidad de invadir piel, membranas mucosas y órganos internos de humanos y animales causando infecciones supurativas en la piel, acné, osteomielitis, endocarditis, infecciones de tracto respiratorio y septicemia. Es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo, catalasa y coagulasa positivo, oxidasa negativo, no móvil, β hemolítico que crece en presencia de manitol y NaCl (7,5%) (Algammal et al., 2020; Cervantes-García et al., 2014; Pasachova et al., 2019; Silva et al., 2020).

Los MRSA componen un biotipo zoonótico virulento de *S. aureus*, resistentes a cefoxitina y meticilina por la presencia del gen *mecA*. Se caracterizan por poseer un patrón de resistencia múltiple, en el que incluyen penicilinas, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas y lincosamidas (Algammal et al., 2020). De hecho, esta habilidad de adquirir resistencia de forma rápida a cualquier antibiótico, es la mayor complicación observada para los tratamientos actuales y futuros (Lee et al., 2018).

Dada su capacidad de resistencia múltiple, la vancomicina ha sido la droga empleada históricamente como el último recurso para el tratamiento de MRSA, sin embargo, su uso cada vez es menos efectivo en infecciones estafilocócicas y se han reportado cepas de *S. aureus* vancomicina resistentes (Cong et al., 2020).

Recientemente se han desarrollado nuevos fármacos para el tratamiento de MRSA como ceftarolina, ceftobiprol, dalbavancin, oritavancin, iclaprim y delafloxacin, de los cuales algunos continúan en periodos de prueba (O'Riordan et al., 2018; Turner et al., 2019)

Clasificación y Taxonomía

Se ha clasificado a la bacteria en base al sitio donde se la adquirió como *S. aureus* meticilino resistentes hospitalarias (HA-MRSA) o adquiridas en la comunidad (CA-MRSA). Las cepas con cassette cromosomal tipo SCCmec tipo I, II o III generalmente son del tipo hospitalario, mientras que las cepas con SCCmec IV o V se han relacionado con cepas adquiridas en la comunidad, que además se diferencian de las anteriores por poseer genes codificantes de leucocidina de Panton-Valentine (PVL), por su crecimiento rápido y por presentar resistencia a una gama menor de antibióticos (Cervantes-García et al., 2014; Sit et al., 2017).

Tabla 1

Taxonomía de Staphylococcus aureus

Dominio	Bacteria
Superfilo	Posibacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Staphylococcaceae
Género	<i>Staphylococcus</i>
Especie	<i>Staphylococcus aureus</i>

Nota. Adaptado de Liu (2015).

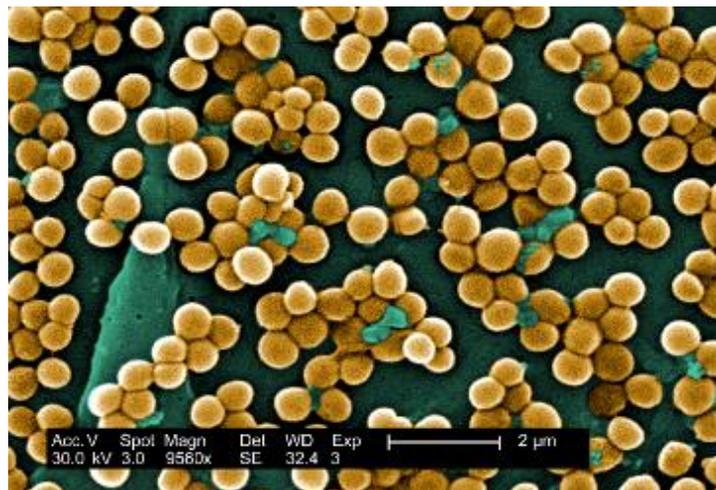
Morfología

S. aureus es identificable en los cultivos a partir de las 18-24 horas de ser incubada, sus colonias se caracterizan ya que gracias a la producción de carotenoides su tono es dorado

brillante y poseen halo amarillo, con un diámetro de 0.5-1.5 μm , bordes lisos y enteros, su consistencia es cremosa y su forma redonda y elevada. Microscópicamente se pueden visualizar circunferencias con diámetros entre 0.8-1.5 μm agrupadas en pares, cadenas o racimos, algunas cepas se observan con una mucosa recubriéndolas (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2012).

Figura 2

Staphylococcus aureus metilino resistentes en microscopio electrónico de barrido



Nota. Magnificación 9560X y cromática digitalizada. Tomado de *Staphylococcus aureus*

[Fotografía], por J. Haney, 2005, Centers for Disease, Control and Prevention

(<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=10046>).

Epidemiología

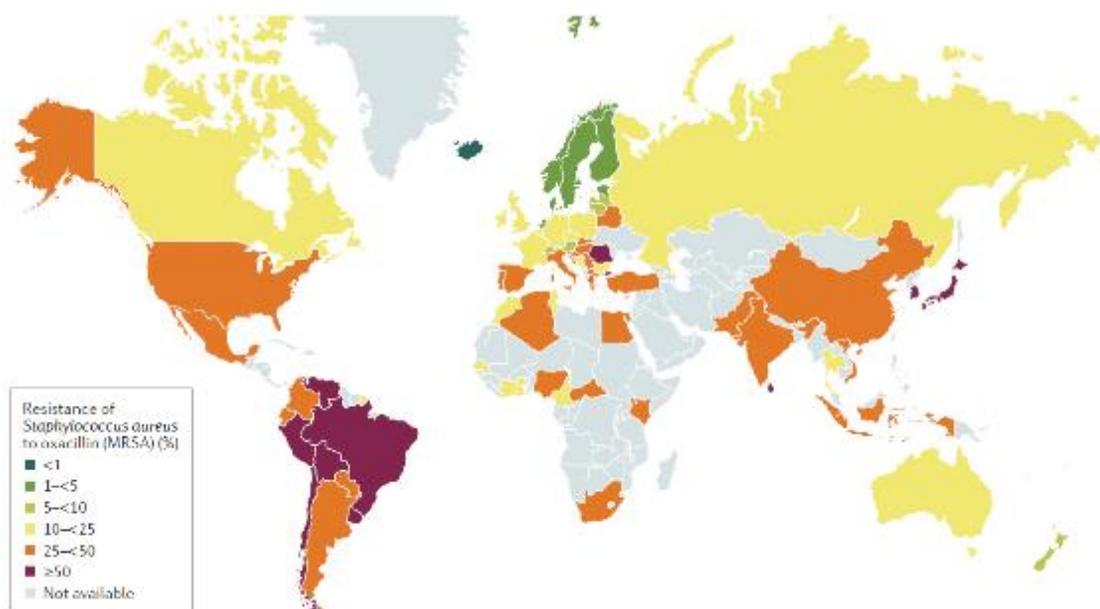
Los principales reservorios de *S. aureus* son las fosas nasales, seguidas del tracto orofaríngeo, las axilas, la región inguinal y el tracto gastrointestinal, sin embargo, la bacteria puede estar en cualquier tejido del cuerpo. Generalmente las cepas colonizadoras coinciden con las infectantes en un 80% de los casos, lo que indica que la colonización aumenta el riesgo de bacteremia. Este fenómeno puede durar por largos periodos de tiempo y ser variable, pues se

ha demostrado que las cepas MRSA no solo evolucionan en el hospedador, sino que además se reemplazan (Azarian et al., 2016; Brown et al., 2014).

Como consecuencia de la fácil diseminación de este microorganismo por contacto directo o indirecto, se ha aumentado exponencialmente la presencia de MRSA en hospitales y comunidades, se lo ha calificado como la causa mayoritaria de morbilidad y mortalidad en pacientes y en individuos sanos (Goudarzi et al., 2017; Tsouklidis et al., 2020). Como ejemplo, en 2017, sólo en Estados Unidos, MRSA causó el deceso de alrededor de 20.000 personas y se estimó que al menos 53 millones de habitantes en el mundo son portadores de la bacteria, en añadidura, aproximadamente el 25% de la población es portadora asintomática de *S. aureus* en sus fosas nasales (Etter et al., 2020; Kavanagh, 2019; Tardón, 2014).

Figura 3

Prevalencia de MRSA a nivel mundial



Nota. Tomado de *Worldwide prevalence of MRSA* (p.3) por A. Lee et al., 2018, Nature Reviews Disease Primers.

Genoma

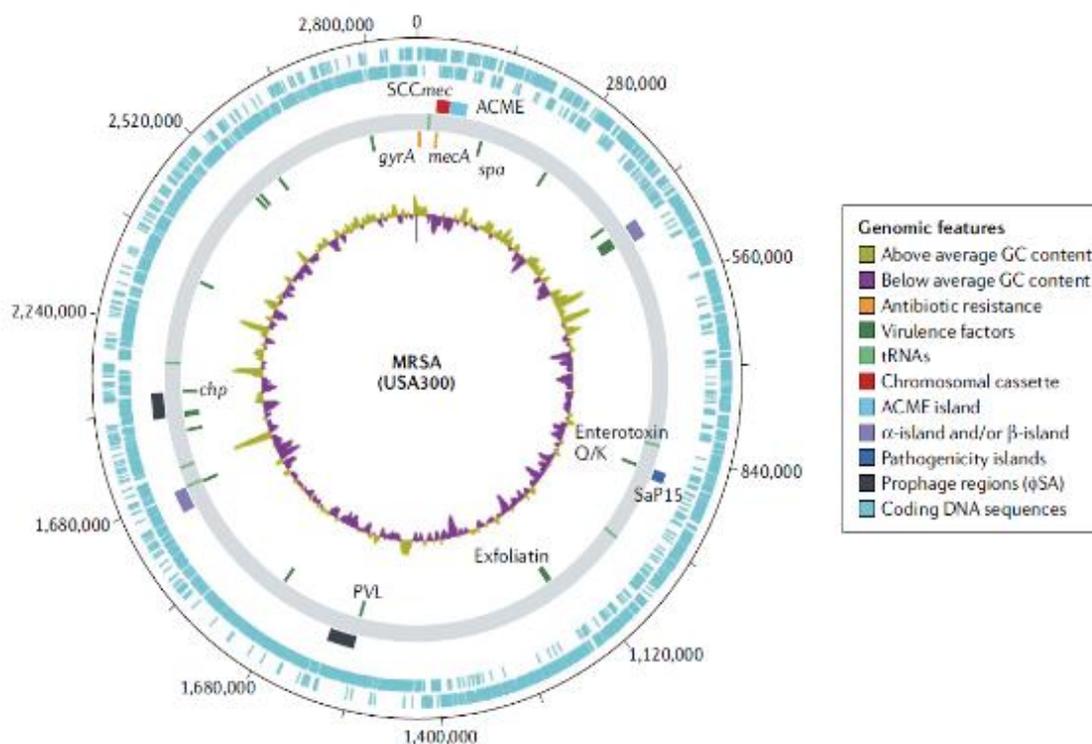
S. aureus posee un genoma circular de 2.8kb aproximadamente, el 84.5% de este corresponde a marcos de lectura abierta (ORF), se caracteriza por tener un 33% de G-C y por ser portador de secuencias de inserción, plásmidos y transposones que codifican para factores de virulencia además le otorgan resistencia ante iones metálicos y antibióticos (Cervantes-García et al., 2014).

Los betalactámicos incluyendo la meticilina, ejercen su efecto al inactivar las proteínas de unión a penicilina (PBPs), enzimas esenciales para la síntesis de la pared celular. El gen *mecA* que aporta la resistencia característica a estas cepas se traduce en una proteína alterada de unión a penicilina, PBP2a, por lo que estos fármacos no poseen acción alguna (Fuda et al., 2004).

Este gen se encuentra dentro de un elemento genético móvil de 20.9-66.9 kb conocido como cassette cromosómico estafilocócico *mec* (*SCCmec*). Existen dos teorías sobre su origen: la hipótesis de un solo clon implica que el elemento genético móvil ingresó a la población de *S. aureus* en una ocasión determinada resultando en la formación de un solo clon de MRSA que se ha diseminado, mientras que la segunda hipótesis plantea que la transferencia horizontal del *SCCmec* a cepas precursoras de *S. aureus* susceptibles a meticilina (MSSA), provocó una evolución constante de las cepas bacterianas (Enright et al., 2002; Gnanamani et al., 2017).

Figura 4

Elementos genómicos mayoritarios en MRSA



Nota. Mapa genómico representativo de la cepa FPR3757. El círculo interno o pista 1 representa el contenido de GC. Hacia el exterior, la circunferencia 2 muestra genes seleccionados de resistencia a antibióticos en naranja y factores de virulencia en verde. La circunferencia 3 muestra la ubicación de los ARNt. La circunferencia 4 muestra elementos genéticos móviles seleccionados, casetes cromosómicos en rojo, varias islas de patogenicidad en tonos de azul a violeta y profagos en negro. Las dos circunferencias exteriores (5 y 6) representan secuencias de codificación en azul. Tomado de *Major genomic elements in methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (p. 204) por N. Turner et al., 2019, Nature Reviews Microbiology.

Se han reportado once tipos de SCCmec, no obstante, solo los tipos I-V se distribuyen por el mundo mientras que al resto se los ha definido como poco comunes y pueden

presentarse de forma localizada según su origen (Lakhundi & Zhang, 2018; Sit et al., 2017). Las características en común de estas islas genómicas incluyen su inserción en el cromosoma junto al gen *orfX* y la presencia de los complejos de genes *mec* y *ccr*. En la primera agrupación nucleotídica se tiene al gen *mecA* mencionado previamente y a los genes *mecl* y *mecR* con funciones relacionadas al control de la expresión de la resistencia a meticilina. El segundo grupo de genes por su parte se encarga de codificar recombinasas sitio específicas que permiten la movilidad del cassette cromosomal (Aguayo et al., 2018; Liu, 2015).

Tabla 2

Estructura genética de los diferentes cassettes cromosomales de S. aureus

SCC <i>mec</i>	Complejo de genes <i>mec</i>	Estructura del complejo de genes <i>mec</i>	Complejo de genes <i>ccr</i>	Genes <i>ccr</i>
I	Clase B	<i>IS1272-DmecR1-mecA-IS431</i>	Tipo 1	<i>ccrA1, ccrB1</i>
II	Clase A	<i>mecl-mecR1-mecA-IS431</i>	Tipo 2	<i>ccrA2, ccrB2</i>
III	Clase A	<i>mecl-mecR1-mecA-IS431</i>	Tipo 3	<i>ccrA3, ccrB3</i>
IV	Clase B	<i>IS1272-DmecR1-mecA-IS431</i>	Tipo 2	<i>ccrA2, ccrB2</i>
V	Clase C2	<i>IS431-mecA-DmecR1-IS431</i>	Tipo 5	<i>ccrC1</i>
VI	Clase	<i>B IS1272-DmecR1-mecA-IS431</i>	Tipo 4	<i>ccrA4, ccrB4</i>
VII	Clase C1	<i>IS431-mecA-DmecR1-IS431</i>	Tipo 5	<i>ccrC1</i>
VIII	Clase A	<i>mecl-mecR1-mecA-IS431</i>	Tipo 4	<i>ccrA4, ccrB4</i>
IX	Clase C2	<i>IS431-mecA-DmecR1-IS431</i>	Tipo 1	<i>ccrA1, ccrB1</i>
X	Clase C1	<i>IS431-mecA-DmecR1-IS431</i>	Tipo 7	<i>ccrA1, ccrB6</i>
XI	Clase E	<i>blaZ-mecC-mecR1-mecl</i>	Tipo 8	<i>ccrA1, ccrB3</i>

Nota. Tomado de *Estructura genética de los diferentes tipos de cassettes cromosomales*

descritos en Staphylococcus aureus (p.11) por A. Aguayo, et. al., 35, 2018, Revista Chilena de Infectología.

Factores de Virulencia

Las bacterias patogénicas poseen la capacidad de generar moléculas que les permiten colonizar, invadir y generar daño en diversos tejidos al tiempo que pueden modificar su virulencia para adaptarse a la respuesta inmune del hospedero, estos componentes son conocidos como: factores de virulencia. En el caso de *S. aureus*, estos factores se regulan durante el crecimiento de la bacteria, fundamentalmente por el sistema *agr* o sistema de detección de quórum en el caso de hemolisinas, leucocidinas y de la proteína A, no obstante, los hallazgos *in vivo* sugieren que los mecanismos de regulación de los factores de virulencia son complejos y divergen de los mecanismos generados a nivel *in vitro* (Cepas y Soto, 2020; Oogai et al., 2011). Los principales factores de virulencia de MRSA se describen en la Tabla 3

Tabla 3

Factores de virulencia de MRSA

Factor de virulencia	Característica	Estudio
Polisacáridos capsulares	Son polímeros que rodean la pared celular.	
	Aumentan la virulencia al alterar el mecanismo de acción del sistema de complemento y de los anticuerpos, además inhiben la fagocitosis.	Cheung et al., (2021)
Proteína estafilocócica A	Esta molécula se ubica en la pared celular y se une a los IgGs circulantes de forma que previene la opsonización por parte del sistema de complemento y evita la fagocitosis.	Kong et al., (2016), Van Kessel et al., (2014)

Factor de virulencia	Característica	Estudio
Componentes de superficie microbiana que reconocen moléculas de matriz adhesiva	<p>En la superficie de la célula, se han detectado varias moléculas como: Proteína A y B que se unen a fibronectina, proteínas de unión a colágeno y factores de aglutinación A y B. Estos factores interactúan con moléculas del hospedero e inician el proceso de adherencia al tejido.</p>	Vazquez et al., (2011)
Hemolisinas	<p>Se han detectado toxinas alfa, beta, gamma y delta, de las cuales alfa está presente en las cepas más patogénicas de MRSA.</p>	Otto, (2014)
Enterotoxinas	<p>Son potentes exotoxinas gastrointestinales sintetizadas durante la fase logarítmica de crecimiento o durante la transición de la fase exponencial a la estacionaria. Son activos en cantidades de nanogramos a microgramos. Su acción se produce por dos proteínas secretoras,</p>	Argudín et al., (2010)
Leucocidina Pantone-Valentine (PVL)	<p>Fy S, en humanos PVL destruye la membrana plasmática de células polimorfo-nucleares y estimula la liberación de especies reactivas del oxígeno, la liberación de IL-8, de lisozimas y de histamina.</p>	Abouelfetouh, (2017)
Toxina del síndrome de choque tóxico (TSST)	<p>Activa la liberación de TNF-α, IL-1 e IL-2 produciendo altas tasas de morbilidad y mortalidad.</p>	Dinges et al., (2000)

Factor de virulencia	Característica	Estudio
Toxinas exfoliativas (ETs)	Son proteasas que reconocen e hidrolizan a proteínas desmosómicas de la piel. Causan el síndrome de piel escaldada sobre todo en bebés.	Bukowski et al., (2010)
Coagulasas	<i>S. aureus</i> produce dos coagulasas, la estafilocoagulasa y el factor de VCon Willebrand que forman coágulos de fibrina en el plasma sanguíneo, lo que inhibe la fagocitosis y favorece la adhesión de la bacteria a catéteres.	Otto, (2014)
Proteasas, lipasas, nucleasas, hialuronidasas, fosfolipasa C, metaloproteinasas y estafiloquinasa	Estas enzimas y polisacáridos extracelulares se involucran en procesos de destrucción de tejidos por lo que facilitan la penetración.	Gnanamani et al., (2017)
Proteína inhibidora de la quimiotaxis (CHIPS)	Inhibe la quimiotaxis de neutrófilos y monocitos.	Postma et al., (2004)
Proteína de adherencia extracelular (Eap)	Además de unirse a la matriz de la célula de hospedero, a sus proteínas plasmáticas y a ICAM-1, posee funciones inmunomoduladoras.	Edwards et al., (2012)

Tipificación molecular de *Staphylococcus aureus*

Las estrategias existentes para realizar caracterización molecular, permiten entender la naturaleza clonal de un microorganismo causante de brotes clínicos específicos además se

puede identificar adecuadamente las particularidades de un patógeno presente en pacientes con episodios infecciosos reiterantes (Chavez & Martinez, 2019).

Secuenciación del Gen Codificante de la Proteína A (Spa Typing)

La proteína A es un factor de virulencia importante de *S. aureus*, se encuentra en la pared celular. Posee una región involucrada en su secreción, otra denominada región X (con dos subdivisiones) y 5 dominios de unión a inmunoglobulinas. En la región X se ha delineado la zona constante Xc y la región variable Xr compuesta de secuencias cortas repetidas (SSRs). La técnica spa-typing toma ventaja de la variabilidad en longitud y del polimorfismo de las secuencias de los SSRs para emplear la región Xr como marcador en la caracterización de MRSA (Carmona et al., 2012; Hashemizadeh et al., 2020).

Dado que esta técnica implica la secuenciación de un solo gen, presenta grandes ventajas relacionadas con la rapidez, la simplicidad y la facilidad de estandarización y reproducibilidad comparada con otros sistemas (Wang, 2020).

Análisis de Polimorfismo de Locus Múltiples con Número Variable de Repeticiones en Tándem (MLVA)

La metodología MLVA (Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis) fue descrita en 2003 para *S. aureus* por Sabat y sus colaboradores. Este enfoque se basa en el estudio de siete loci individuales (clfA, clfB, sdrC, sdrD, sdrE, sspA y spa) denominados VNTRs (Variable-Number Tandem Repeat). A estos se los amplifica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple obteniendo un patrón de bandas característico para cada aislado. Esto permite establecer relaciones evolutivas entre aislados, además se diferencia por su alto poder discriminatorio y buenos niveles de reproducibilidad (Rodríguez-Acosta et al., 2017).

Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)

El método fue desarrollado en 1984 por Schwartz y Cantor quienes agregaron campos eléctricos a la electroforesis convencional con el fin de separar moléculas grandes de DNA (hasta 10Mb). Bajo esta metodología, y en presencia de concentraciones altas de gel el DNA es elongado a lo largo de la dirección del campo lo que facilita su ingreso en los poros del gel (Cardozo et al., 2013; Yeung & Gorn, 2021).

Para su realización, primero se genera una lisis celular de las bacterias embebidas en tampones de agarosa de bajo punto de fusión, para poder aislar el DNA cromosómico. Seguido se aplican endonucleasas de restricción y se generan fragmentos del ácido nucleico, de elevado peso molecular y se los somete al campo pulsado. Se usan 24 electrodos espaciados en un contorno hexagonal que alternan la dirección en un ángulo de 120° durante un periodo electroforético prolongado de forma que el cambio de la dirección de la corriente provoca la reorientación del DNA hacia el ánodo (He et al., 2014; Tankeshwar, 2021).

Secuenciación Multilocus (MLST)

Esta técnica permite la diferenciación de cepas de un microorganismo mediante el análisis de las secuencias parciales de fragmentos de una serie de genes conservados o housekeeping, denominados así pues las proteínas que codifican son clave en el metabolismo y mantenimiento de la viabilidad celular por lo que la tasa de mutación en estos muy baja. Las combinaciones alélicas generadas por la presencia de mutaciones específicas en estos genes permiten la identificación de tipos bacterianos específicos mediante el denominado perfil alélico, tipo de secuencia o sequence type (ST) (Aguayo, 2020).

MLST fue descrita en 1998 para *Neisseria meningitidis* por Maiden y sus colaboradores, quienes usaron fragmentos de 500 pb, de 7 loci de genes conservados en ese microorganismo, a

partir de eso, por su efectividad la técnica se ha desarrollado para distintas especies bacterianas y se han anotado en varias bases de datos los genes a analizar en cada caso (García, 2019).

Tabla 4

Primers requeridos para 7 genes housekeeping de MRSA

Gen	Proteína codificada	Primers
<i>arcC</i>	Carbamato quinasa	arc up - 5' TTG ATT CAC CAG CGC GTA TTG TC -3' arc dn - 5' AGG TAT CTG CTT CAA TCA GCG -3'
<i>aroE</i>	Shikimato deshidrogenasa	aro up - 5' ATC GGA AAT CCT ATT TCA CAT TC -3' aro dn - 5' GGT GTT GTA TTA ATA ACG ATA TC -3'
<i>glpF</i>	Glicerol quinasa	glp up - 5' CTA GGA ACT GCA ATC TTA ATC C -3' glp dn - 5' TGG TAA AAT CGC ATG TCC AAT TC -3'
<i>gmk</i>	Guanilato quinasa	gmk up - 5' ATC GTT TTA TCG GGA CCA TC -3' gmk dn - 5' TCA TTA ACT ACA ACG TAA TCG TA -3'
<i>pta</i>	Fosfato acetiltransferasa	pta up - 5' GTT AAA ATC GTA TTA CCT GAA GG -3' pta dn - 5' GAC CCT TTT GTT GAA AAG CTT AA -3'
<i>tpiA</i>	Triosafosfato isomerasa	tpi up - 5' TCG TTC ATT CTG AAC GTC GTG AA -3' tpi dn - 5' TTT GCA CCT TCT AAC AAT TGT AC -3'
<i>yqiL</i>	Acetil coenzima A acetiltransferasa	yqi up- 5' CAG CAT ACA GGA CAC CTA TTG GC -3' yqi dn- 5' CGT TGA GGA ATC GAT ACT GGA AC -3'

Nota. Adaptado de *Sequences of primers used in the PCR* (p.1009) por M. Enright et al., 2000,

Journal of Clinical Microbiology

Capítulo III: Metodología

Participantes

La parte experimental de este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Humana de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, bajo la dirección del Dr. Marcelo Grijalva, M.D., Ph.D. Además de tutorías a cargo del Dr. Francisco Flores, Ph.D. y la Ing. Tatiana Lara.

Zona de Estudio

El presente trabajo se ejecutó en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, en el Laboratorio de Biotecnología Humana, ubicado en la Avenida General Rumiñahui, de la parroquia de Sangolquí, del Cantón Rumiñahui de la provincia de Pichincha, localizado en Latitud: 0°18'52.329, Longitud: 78°26'37.29, Altura elipsoidal: 2497 m.

Periodo de Investigación

El trabajo de titulación se inició en el mes de marzo de 2021 y se culminó en diciembre del mismo año.

Recuperación de Aislados Clínicos

Las muestras utilizadas para el trabajo consistieron en hemocultivos procedentes de los Hospitales Eugenio Espejo (HEE) y Carlos Andrade Marín (HCAM), mismos que desde el año 2015, habían sido criopreservados en el Laboratorio de Biotecnología Humana.

Para la selección de las cepas meticilino resistentes se acudió a la base de datos del cepario obteniendo 53 muestras con las características deseadas. De estos, 32 se encontraban almacenados por 8 meses en viales de caldo infusión cerebro-corazón (BHI) suplementado con glicerol a -80°C en el ultracongelador ULUF 125 (Artiko) y 21 muestras se encontraban desde 2018 en TSA a 4°C. Todas las muestras se colocaron a temperatura ambiente por una hora y

luego en incubadora a 36°C por 15 minutos. En la cámara de flujo laminar se transfirieron 100uL de cada aislado a 5mL de caldo nutriente y se guardó en la incubadora digital con agitación (311DS, Labnet) a 36°C por 20 horas. También se colocaron 50uL del vial original en cajas Petri con agar nutriente (Merck), agar de soya triptona (TSA) (Beckton, Dickinson and Company) y agar sangre al 5% (Beckton, Dickinson and Company) y se sembró por estrías (Public Health England & National Health Service, 2020; Vitko & Richardson, 2013).

Concluidas 20 horas se revisaron los medios mencionados y se realizó tinción Gram de aquellas colonias que presentaban crecimiento. Se verificó la presencia de cocos Gram-positivos empleando el microscopio óptico (CX31, Olympus) y a aquellas muestras puras y de interés, se las sembró en viales con BHI (Liofilchem) suplementados con glicerol al 20% y además en crioviales (CryoBank Mixed, COPAN Diagnostics Inc.) para luego almacenarlas a -80°C (Missiakas & Schneewind, 2013).

Caracterización Molecular

En este paso se empleó la técnica de PCR múltiplex para verificar la presencia de genes característicos de *S. aureus* además de comprobar la presencia del gen de resistencia a meticilina en el genoma de los aislados.

Extracción manual de DNA

Para este paso se empleó el protocolo de extracción establecido previamente por el Laboratorio de Biotecnología Humana. Para esto se inocularon 100uL de los viales con BHI, en 5mL de caldo nutritivo y se incubaron a 36°C durante 18-24 horas. Transcurrido este tiempo y para obtener duplicados, se colocó en 2 tubos Eppendorf (2mL), 1.8 mL del cultivo y se centrifugó a 14000rpm por 10 minutos (Minispin Plus 5453, Eppendorf). Finalmente, se desechó el sobrenadante.

Se resuspendió el pellet obtenido en 400uL de Buffer de lisis Tris (50mM Tris, pH 8.0, 50mM EDTA, 50mM sacarosa, 100mM NaCl, 1%SDS, 15uL de proteinasa K 20mg/mL y LiCl 0.2%) (Willner et al., 2012). Se agregaron perlas de vidrio y se agitó mediante vortex. Luego de colocar los tubos en hielo por 3 minutos, se emplearon 4 ciclos de congelación-descongelación mediante la transferencia a hielo y a vortex por 1 minuto cada uno. Se dejó incubar toda la noche (20 horas) a 50°C con agitación a 300 rpm (Ep Thermomixer, Eppendorf).

Seguido se centrifugaron las muestras a 10000 rpm por 5 minutos, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 2mL y se le añadieron 400uL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 vol/vol). Se homogenizó por inversión y vortex durante 15 segundos y se centrifugó nuevamente a 12000 rpm por 10 minutos. Evitando topar las fases inferiores, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5mL.

Se aumentaron 100 µL de cloruro de sodio 5M y, gota a gota, 500 µL de etanol 100% mantenido a 4°C, se mezcló delicadamente por inversiones. Se incubó la mezcla por 30 min a -80°C y se centrifugó a 12 000 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante y por dos ocasiones, se añadió 500 µL de etanol 70% mantenido a 4°C y se centrifugó a 12 000 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante. Al pellet se lo dejó secar a temperatura ambiente por 1 minuto y luego se lo resuspendió en 50µL de Tris HCl 10mM pH 7,5-8,5. Se reservaron 5uL para realizar electroforesis y el resto de DNA se almacenó a -20 ° C, hasta su cuantificación.

Electroforesis

Para la observación de la presencia o ausencia de DNA luego de las extracciones y PCRs realizadas se empleó el mismo procedimiento. Se utilizaron geles de agarosa ultrapura (Invitrogen) al 2% (v/w) los cuales se prepararon empleando ciclos de agitación-calentamiento y se culminaron con la adición de 0,06 µL de SYBR Safe (Invitrogen) por cada mL de buffer TBE 1X.

Para el caso de extracción de DNA, se emplearon 2uL de azul de bromofenol en 3uL de muestra como marcador de avance. En todos los ensayos el marcador molecular utilizado fue el 1kb Opti-Dna Marker (ABM).

Cuantificación de DNA

En este paso se empleó un equipo NanoDrop (ThermoFisher). Se empleó como blanco Tris HCl 10mM pH 7,5-8,5 y se midió la concentración de DNA y los ratios 260/280 y 260/230.

PCR multiplex para la caracterización de los aislados

Se empleó el protocolo de PCR multiplex establecido por Noboa (2020), empleando los primers disponibles en el Laboratorio de Biotecnología Humana para la amplificación de los genes *nuc*, *16S* y *mecA*.

Secuenciación de genes metabólicos

PCR para amplificación de genes metabólicos

Los 7 genes metabólicos empleados en este estudio se detallan en la Tabla 4. Para la PCR se empleó el kit GoTaq Flexi Polymerase (Promega). En las siguientes tablas se detalla la concentración inicial y final de cada componente necesario para la realizar la PCR con un volumen final de 15 μ L tomando como base la información otorgada por (Promega, 2018).

Tabla 5

Componentes de la PCR para amplificación de genes arcC, qmk, pta, glpF, tpiA, yqi

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μ L)
5X Green GoTaq FlexiBuffer	5 X	1 X	3
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	0,9
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,3

Primer upstream	10 μ M	0,5 μ M	0,75
Primer downstream	10 μ M	0,5 μ M	0,75
GoTaq Polymerase	5 u/ μ L	0,125 u/ μ l	0,38
*DNA	20 ng/ μ L	1 ng/ μ L	0,75
Agua			8,18
Vf			15

Nota. * ng totales de DNA= 15ng

Tabla 6

Componentes para la PCR para amplificación del gen aroE

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μ L)
5X Green GoTaq FlexiBuffer	5 X	1 X	3
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	0,9
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,3
Primer upstream	10 uM	1 μ M	1,5
Primer downstream	10 uM	1 μ M	1,5
GoTaq Polymerase	5 u/uL	0,125 u/ μ l	0,38
*DNA	20 ng/uL	1 ng/ μ L	0,75
Agua			6,68
Vf			15

*Nota.** ng totales de DNA= 15ng

Para la estandarización del programa se siguieron los parámetros establecidos por Saunders y Holmes (2014), y se modificaron con base a los requerimientos de la polimerasa empleada (Tabla 7). El equipo empleado para la amplificación fue el LightCycler® 96 (Roche).

Tabla 7

Programa PCR para amplificación de genes metabólicos usando GoTaq Polymerase

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	95	2 min	1
Denaturación	94	30 s	
Annealing	55	30 s	30
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	5 min	1

La presencia de los genes amplificados se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa ultrapura (Invitrogen) al 2%, la corrida se realizó empleando 3 µL del producto amplificado, por 1 hora 30 minutos a 100 voltios con la fuente de poder EC-300XL (Thermo Scientific). El fotodocumentador empleado fue ChemiDoc MP (Bio-Rad).

Purificación de productos de PCR de genes metabólicos

Aquellas muestras que presentaron bandas claras y sin inespecificidades fueron sometidas al proceso de purificación con el Kit de Invitrogen: PureLink® Quick PCR Purification Kit™. Para esto, por cada 10µL de muestra, se colocaron 40µL de Binding Buffer B2 (Para purificar fragmentos de PCR de 100bp a 12kb) y se homogenizó bien. Seguido se cargaron las muestras en el centro de una columna de purificación colocada en un tubo colector y debidamente etiquetada. Se centrifugó a 10000 g por 1 minuto utilizando el la centrífuga refrigerada 5804R (Eppendorf). Se descartó el remanente presente en el tubo colector.

Seguidamente se colocaron 650µL de Wash Buffer (W1) e cada columna, se centrifugó a 10000g por 1 minuto, y se descartó aquello que se encontraba en el tubo colector. Se centrifugó nuevamente a 20000g por 3 minutos. En un tubo de elución de 2mL debidamente etiquetado, se

colocó la columna y se añadieron 14µL de Elution Buffer. Se centrifugó a 20000g por 2 minutos. El DNA purificado se encontraba en el tubo de elución. Las muestras se almacenaron a 4°C para uso inmediato o a -20° para almacenamiento a largo tiempo (Life Technologies Corporation, 2011).

Reacción de secuenciación cíclica

La reacción de secuenciación cíclica se realizó con el kit de Applied Biosystems, BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing, como se detalla en la Tabla 8 Para cada gen constitutivo se empleó solo el primer forward con excepción de los genes *pta* y *yqiL* que fueron tratados también con reverse. Los componentes de la reacción de secuenciación y el programa empleado se estandarizaron a partir del inserto del kit (Applied Biosystems, 2016).

Tabla 8

Componentes para la reacción de secuenciación

Componente	Concentración	Volumen (µL)
Agua	-	1.5
BigDye Terminator v.3.1	2,5X	0.5
BigDye Terminator v3.1 Buffer	5X	0.9
DNA purificado	≈6,5 ng	1.5
Primer (Forward o Reverse)	2 uM	1.6
Volumen total		6

A continuación, se detalla el programa empleado en el termociclador (Roche Life Science, LightCycler® 96).

Tabla 9

Programa PCR para reacción de secuenciación utilizando BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	96	3 min	1
Denaturación	96	10 s	
Annealing	50	5 s	28
Extensión	60	4 min	

Los productos de PCR se almacenaron a 4°C hasta su purificación.

Purificación de productos de PCR de secuencia

En primer lugar, se colocaron 700uL de Sephadex G-50 (Sigma Aldrich) en una columna con filtro embebida en un tubo colector y se centrifugó a 4500rpm por 3 minutos. Seguido se colocó la columna en un nuevo tubo colector debidamente etiquetado y sin tocar la matriz de Sephadex formada, se pipetearon los 6uL de cada muestra. Finalmente se centrifugó nuevamente a 4500rpm por 4 minutos. En los tubos colectores se obtuvieron las muestras purificadas (Chen & Yun, 2006).

Secuenciación Sanger

La secuenciación se realizó empleando el analizador genético 3130 (Applied Biosystems) y el array de capilares, Avant Capillary Array 36cm (Applied Biosystems, CA). Para ensamblar el plato de secuenciación se emplearon 5uL de muestra con 5uL de HiDi formamida por pocillo y para la corrida electroforética se empleó el polímero POP4 (Applied Biosystems, 2016). Los datos brutos de fluorescencia se analizaron en el software Sequencer Analysis Software 5.1 (Applied Biosystems, 2003, USA).

Análisis Bioinformático

Curación de secuencias

Empleando los archivos obtenidos en formato .ab1, se emplearon los software Geneious Prime v 10.1.2 (Kearse et al., 2012) y SnapGene 5.3.2 (GSL Biotech, IL) para realizar la curación de las mismas. Se eliminaron los extremos utilizando la herramienta “Trim Ends” (Biomatters Ltd, 2021) con un límite de probabilidad de error de 0.005, es decir se eliminaron las regiones con más de 0.5% de probabilidad de tener un error por base.

Identificación de números alélicos y secuencias tipo

El número alélico correspondiente a cada locus se obtuvo comparando la secuencia curada de los genes con la base de datos de la Universidad de Oxford Pub-MLST disponible en el sitio https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_saureus_seqdef. Luego de este paso se descargaron los alelos obtenidos en la base de datos y usando el software Geneious Prime 2020.0.4 se los alinearon con las secuencias de la muestra en cuestión usando la herramienta MUSCLE ALIGNMENT (Edgar, 2004), así se confirmó una identidad igual o superior al 98,2%. Además, se empleó la combinación de los 7 números alélicos de cada muestra para obtener su secuencia tipo empleando la misma base de datos.

Análisis de frecuencia alélica y de secuencias tipo

En este paso se empleó la siguiente fórmula para determinar la proporción observada de un alelo específico respecto al conjunto de alelos que corresponden a cada locus y la proporción de una secuencia tipo frente al grupo de opciones obtenidas.

$$Frecuencia\ alélica = \frac{Número\ de\ copias\ del\ alelo}{Número\ de\ copias\ de\ todos\ los\ alelos\ en\ el\ locus}$$

$$Frecuencia\ de\ ST = \frac{Número\ de\ copias\ de\ una\ ST}{Número\ de\ copias\ de\ todas\ las\ ST}$$

Análisis filogenético

Para la filogenia del estudio se emplearon las secuencias individuales de cada gen como también la concatenación de los 7 loci pertenecientes a cada aislado con el fin de alinearlos mediante la herramienta MUSCLE en MEGA-X. En el caso de las concatenaciones se trabajó con longitudes de 456bp para *arcC*, 438bp para *aroE*, 435bp para *glpF*, 409bp para *gmk*, 474bp para *pta*, 311bp para *tpiA* y 401bp para *yqiL*. Seguido, se empleó la herramienta MODELS (Tamura et al., 2011) para determinar el mejor modelo de sustitución nucleotídica para cada caso y se crearon 8 árboles en total con el método estadístico de máxima verosimilitud (ML) y 500 Bootstraps. Para los genes: *arcC*, *aroE*, *gmk*, *yqiL* el mejor modelo de sustitución fue Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), para *glpF* fue Tamura-Nei 1993 con distribución gamma (TN93+G), para *pta* fue general tiempo reversible (GTR) y para *tpiA*, Tamura 1992 (T92). En el caso de las secuencias concatenadas se empleó el modelo de sustitución nucleotídica Hasegawa-Kishino-Yano con distribución gamma y supuesto de independencia (HKY+G+I).

Los árboles de mínima expansión (MSTree) se construyeron empleando el software en línea <http://www.phylovis.net/> mismo que emplea el algoritmo goeBURST (Francisco et al., 2009). Los datos de entrada fueron las secuencias concatenadas en formato FASTA, para el primer árbol de las secuencias de las 26 muestras empleadas en este estudio y para el segundo se aumentaron las secuencias de los ST más comunes en Sur América.

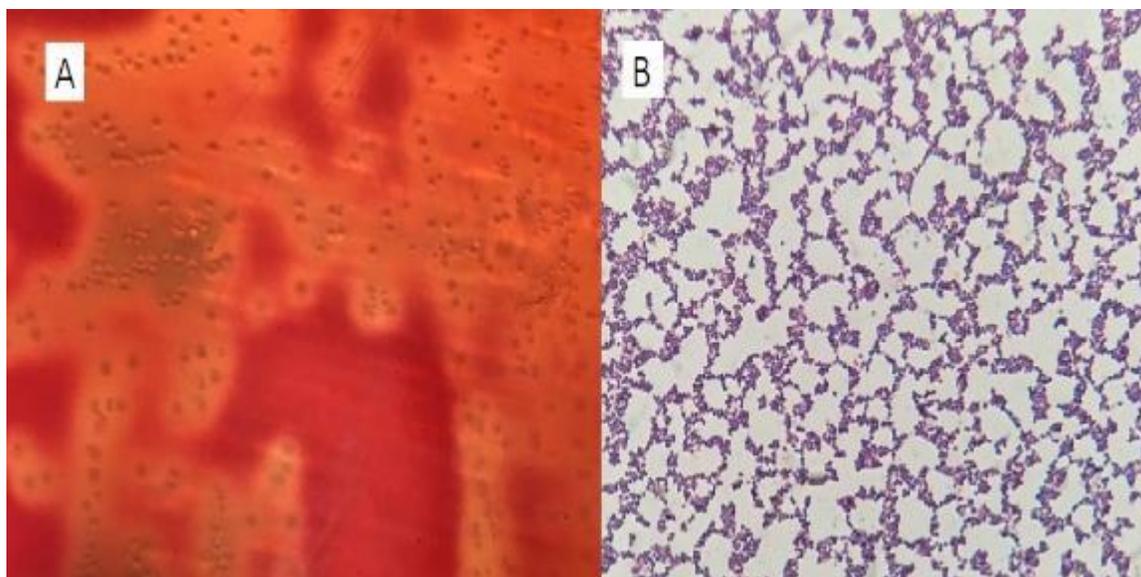
Capítulo IV: Resultados

Recuperación de Aislados Clínicos

De los 53 aislados iniciales, no se obtuvo crecimiento de los almacenados a 4°C. Mientras que las 32 muestras conservadas a -80°C crecieron en la mayoría de medios suplementados. Se comprobó la aparición de colonias doradas con β -hemólisis en agar sangre y la presencia de cocos Gram positivos mediante tinción Gram.

Figura 5

Análisis bioquímico del aislado B6



Nota. A) β -hemólisis en agar sangre al 5%. B) Muestra observada a 100X con aceite de inmersión en microscopio óptico (CX31, Olympus).

Extracción de DNA

Los valores de concentración en ng/ μ L, los ratios 260/280 y 260/230 de las muestras empleadas y sus duplicados se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10*Valores de cuantificación obtenidos luego de la extracción de DNA*

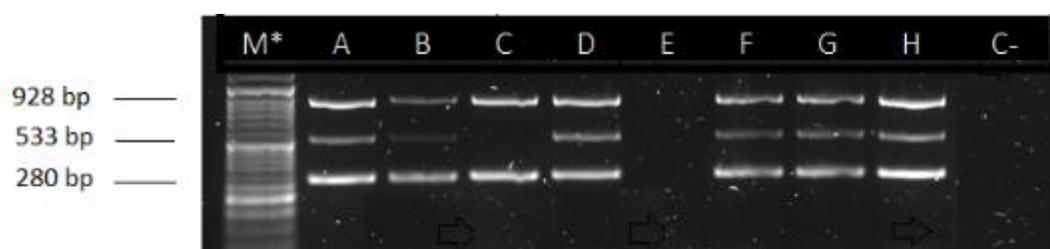
Aislado	Concentración [ng/μL]	260/280	260/230
A11	32,60	2,16	2,49
A12	68,5	2,18	2,47
A13	49,70	2,10	2,27
A14	38,00	2,22	2,53
A15	144,8	2,08	1,74
A16	61,90	2,08	2,04
A17	83,92	2,09	1,48
A18	62,08	2,14	2,04
A19	157,06	2,14	2,32
B5	68,40	2,13	1,22
B6	226,6	2,1	2,05
B7	163,5	2,12	2,18
B8	101,3	2,09	1,83
B9	30,89	1,89	1,98
B10	43,90	2,17	2,03
B11	332,4	2,14	2,26
R1	78,9	2,15	1,75
R2	238,6	2,12	2,05
R5	73,2	2,16	1,78
R6	95,5	2,16	2,11
R8	282,9	2,11	2,11
R9	113,1	2,13	1,85
R10	153,2	2,09	1,51
X8	70,5	2,08	1,76
X9	207,3	2,06	2,06
X10	63,5	2,04	1,97

Identificación de *Staphylococcus aureus* resistentes

Se analizó la presencia de los 3 genes de interés, *16S* de 928bp, *nuc* de 280bp y *mecA* de 533bp, concluido este análisis, se obtuvieron los 26 aislados que poseían las secuencias precisadas y fueron las muestras empleadas para el resto del estudio.

Figura 6

Identificación molecular de MRSA



Nota. PCR multiplex en gel de agarosa. M*: Marcador molecular; A-H: Muestras; C-: Control negativo.

En la Figura 6, se puede apreciar un ejemplo de esta parte del análisis, las muestras que fueron aprobadas para el estudio fueron: A, B, D, F, G y H por poseer los 3 genes de interés, comparado con las muestras C y E que fueron descartadas de la investigación por no presentar dichos genes, en el caso de E no amplificó ningún gen y C no amplificó el gen *mecA*.

Tabla 11

Resultados de PCR multiplex

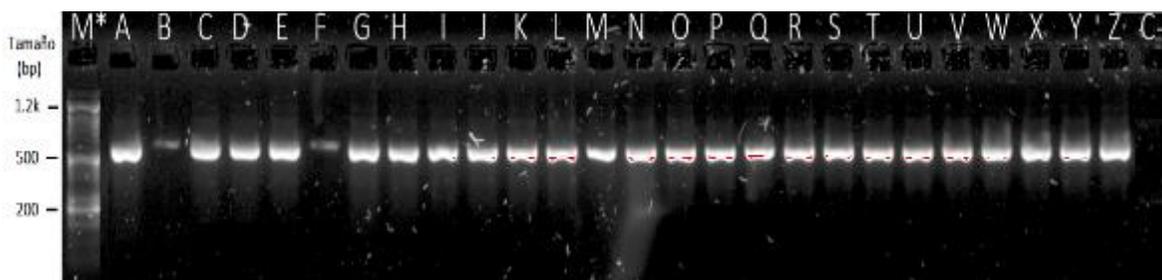
Gen	<i>16S</i>	<i>nuc</i>	<i>mecA</i>
Número de muestras que amplificó el gen	30	29	26

PCR de genes metabólicos o housekeeping

Una vez confirmada la presencia de los genes *16S*, *nuc* y *mecA* en las muestras, se procedió con el ensamblaje de las PCR para cada gen metabólico.

Figura 7

Amplicones obtenidos para gen arcC

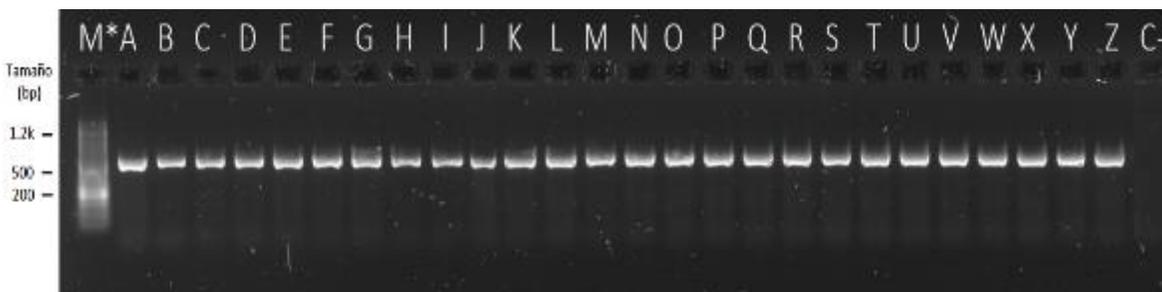


Nota. Gel de agarosa al 2%. M*: Marcador molecular de 100bp; C-: Control negativo de la PCR;

A-Z: Muestras.

Figura 8

Amplicones obtenidos para gen aroE

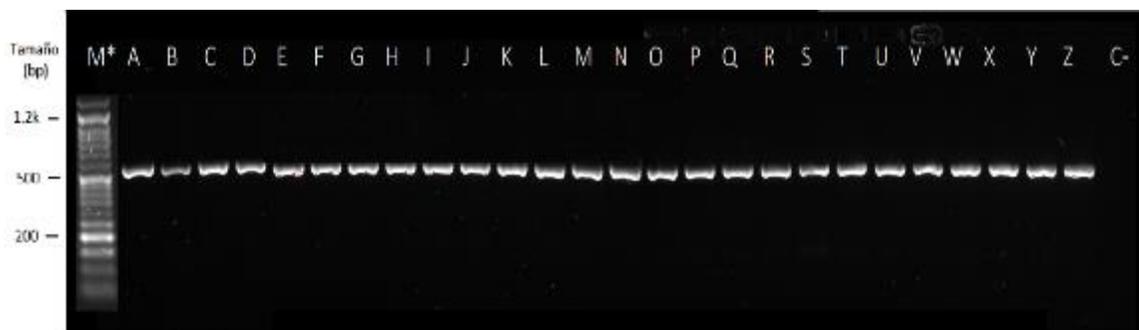


Nota. Gel de agarosa al 2%. M*: Marcador molecular de 100bp; C-: Control negativo de la PCR;

A-Z: Muestras.

Figura 9

Amplicones obtenidos para gen glpF

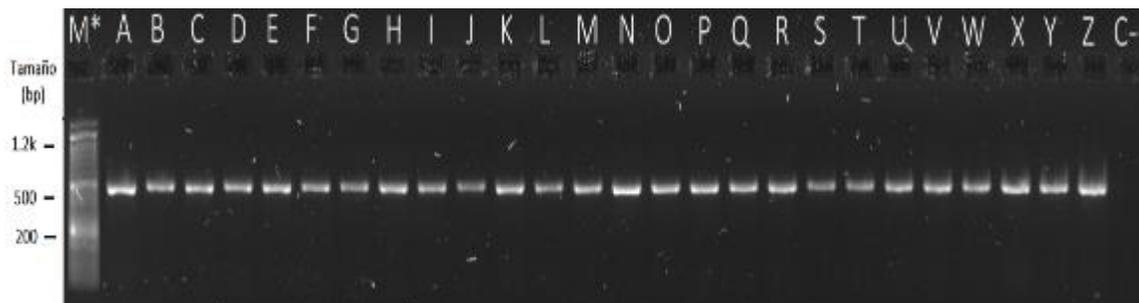


Nota. Gel de agarosa al 2%. M*: Marcador molecular de 100bp; C-: Control negativo de la PCR;

A-Z: Muestras.

Figura 10

Amplicones obtenidos para gen gmk



Nota. Gel de agarosa al 2%. M*: Marcador molecular de 100bp; C-: Control negativo de la PCR;

A-Z: Muestras.

Figura 11

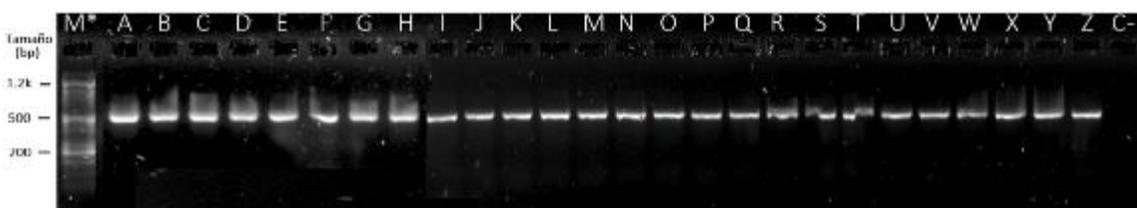
Amplicones obtenidos para gen pta



Nota. Gel de agarosa al 2%. M*: Marcador molecular de 100bp; C-: Control negativo de la PCR; A-Z: Muestras.

Figura 12

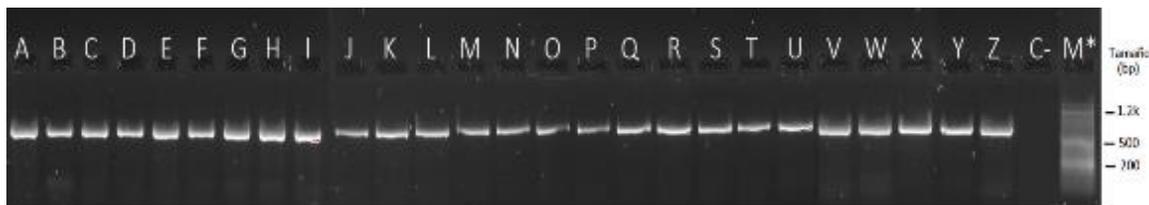
Amplicones obtenidos para gen tpiA



Nota. Gel de agarosa al 2%. M*: Marcador molecular de 100bp; C-: Control negativo de la PCR; A-Z: Muestras.

Figura 13

Amplicones obtenidos para gen yqiL



Nota. Gel de agarosa al 2%. M*: Marcador molecular de 100bp; C-: Control negativo de la PCR; A-Z: Muestras.

Secuenciación Sanger

Las secuencias se obtuvieron en formato .ab1 y los electroferogramas de las mismas junto con sus valores de calidad se exportaron además como PDF para su análisis posterior.

Figura 14

Secuencia obtenida para el gen yqiL de la muestra X10 y sus valores de calidad

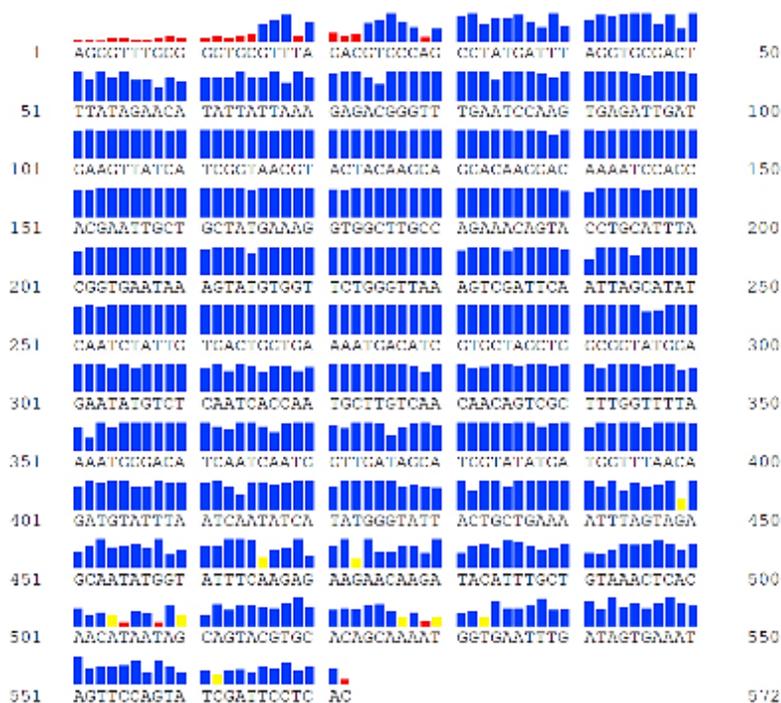
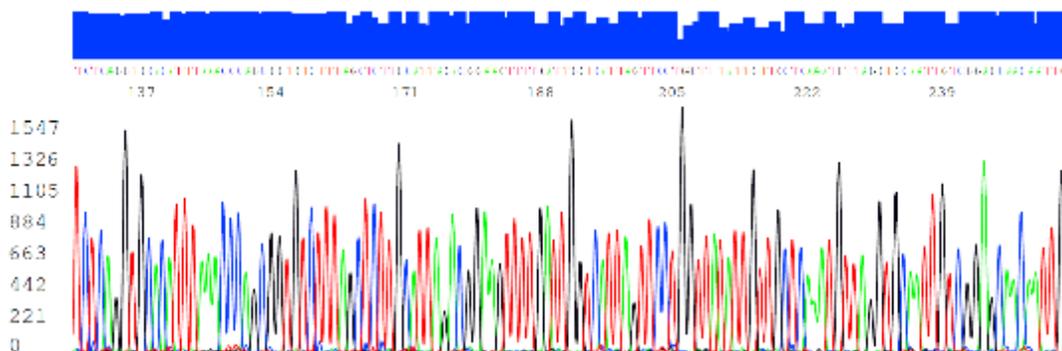


Figura 15

Electroferograma de porción del gen yqiL de la muestra X10



En este estudio se observó la mutación puntual de adenina (A) por guanina (G) en el nucleótido 173 del gen *aroE* en la muestra X8 (Figura 16). Este fenómeno se comprobó repitiendo todo el proceso desde la PCR del gen metabólico hasta la secuenciación del mismo y se verificó empleando tanto primer forward como reverse para este gen. Es importante destacar que la base de datos reconoció este alelo con el número 696, sin embargo, por la mutación observada se lo alineó con otros alelos y no se alcanzó el 100% de similitud, adicionalmente se realizó la traducción del mismo (Figura 17) y se encontró que la mutación es no sinónima pues se reemplaza isoleucina (Ile) por metionina (Met) . Un caso similar ocurre con la mutación observada en la muestra R1 en el nucleótido 326 del gen *pta* (Figura 18), en esta mutación se reemplaza treonina (Thr) por serina (Ser) lo que la base de datos reconoce como el alelo 4 (Figura 19). Finalmente, se observó otra mutación puntual en la muestra A18 en el nucleótido 500 del gen *pta* (Figura 20), pero no se alteró la proteína obtenida al compararla con la de referencia dada por la base de datos (Figura 21). Todas las mutaciones y las variantes alélicas determinadas para las mismas se analizaron con la herramienta BLAST del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), con la finalidad de determinar su porcentaje de identidad con la proteína esperada de cada gen.

Figura 16

Variante alélica con mutación puntual en nucleótido 173 del gen *aroE* en muestra X8

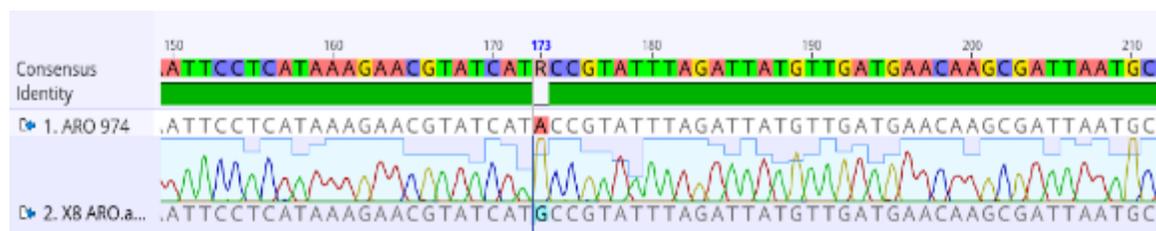


Figura 17

Traducción de mutación en gen *aroE* de muestra X8 comparada con alelo de referencia 974

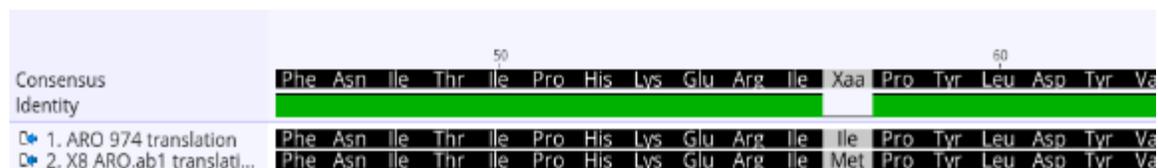


Figura 18

Variante alélica con mutación puntual en el nucleótido 326 del gen *pta* en la muestra R1

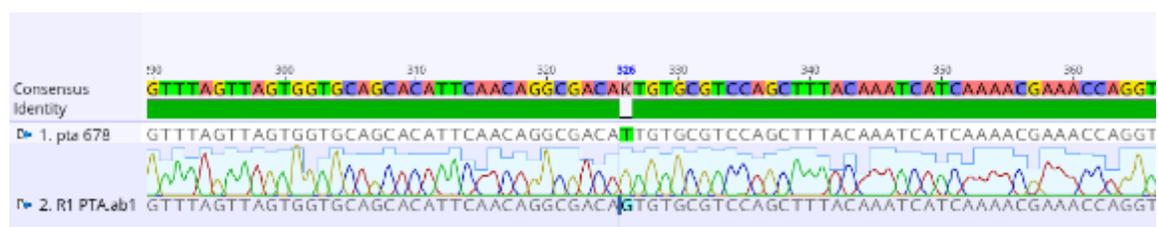


Figura 19

Traducción de mutación en gen *pta* de muestra R1 comparada con alelo de referencia 678

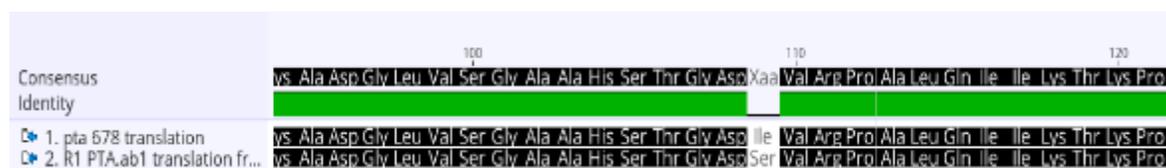


Figura 20

Variante alélica con mutación puntual en el nucleótido 500 del gen *pta* en muestra A18

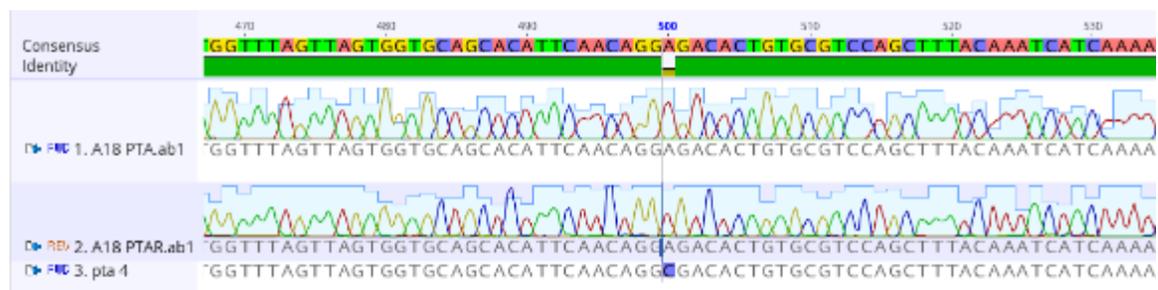
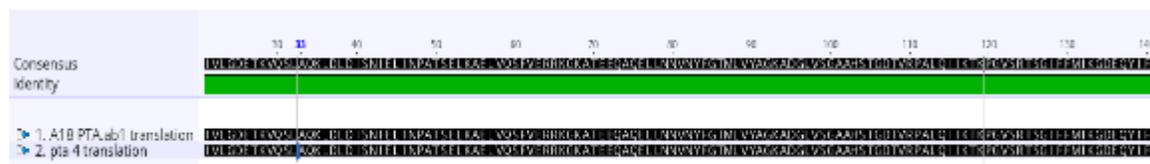


Figura 21

Traducción de mutación en gen *pta* de muestra A18 comparada con alelo de referencia 4



Identificación de números alélicos y secuencias tipo

En este estudio se obtuvieron los perfiles alélicos de todas las muestras, sin embargo, la base de datos no reconoció ninguna secuencia tipo (ST), siendo la mayor coincidencia la de la muestra R6 con un máximo de 4 loci. Sin embargo, al realizar una comparación entre las secuencias no determinadas (ND), se observó la preponderancia de ND1. La muestra R6, también destacó por poseer alelos totalmente diferentes al resto de muestras en 5 de los 7 genes examinados.

Tabla 12

Perfiles alélicos obtenidos para los 26 aislados analizados

Muestra	<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpiA</i>	<i>yqiL</i>	ST
A11	3	974	893	78	4	770	96	ND1
A12	1	377	893	8	834	99	966	ND2
A13	2	974	893	78	4	770	96	ND3
A14	1	377	893	8	834	799	966	ND4
A15	1	377	893	8	834	799	966	ND4
A16	1	971	893	8	4	770	96	ND5
A17	3	974	893	78	4	770	96	ND1
A18	1	971	893	8	4	799	966	ND8
A19	2	974	893	78	4	770	96	ND3
B5	3	974	893	78	4	770	96	ND1

Muestra	<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpiA</i>	<i>yqiL</i>	ST
B6	1	377	893	8	834	799	966	ND4
B7	3	974	893	78	4	770	96	ND1
B8	3	974	893	78	4	770	96	ND1
B9	3	974	893	78	4	770	96	ND1
B10	862	971	893	8	834	799	28	ND6
B11	1	377	893	8	834	799	966	ND4
R1	3	974	893	78	4	770	96	ND1
R2	1	377	893	8	834	799	966	ND4
R5	3	974	893	78	4	770	96	ND1
R6	22	716	14	470	834	770	747	ND7
R8	1	377	893	8	834	799	966	ND4
R9	3	974	893	78	4	770	96	ND1
R10	3	974	893	78	4	770	96	ND1
X8	3	974	893	78	4	770	96	ND1
X9	3	974	893	78	4	770	96	ND1
X10	3	974	893	78	4	770	96	ND1

Nota. ND: No determinado

Tabla 13

Frecuencias de números alélicos obtenidos

Gen	NA	N	F
	1	9	0,346
	2	2	0,077
<i>arcC</i>	3	13	0,500
	22	1	0,038
	862	1	0,038

	377	7	0,269
<i>aroE</i>	716	1	0,038
	971	3	0,115
	974	15	0,577
<i>glpF</i>	14	1	0,038
	893	25	0,962
<i>gmk</i>	8	10	0,385
	78	15	0,577
	470	1	0,038
<i>pta</i>	4	17	0,654
	834	9	0,346
<i>tpiA</i>	99	1	0,038
	770	17	0,654
	799	8	0,308
<i>yqiL</i>	28	1	0,038
	96	16	0,615
	747	1	0,038
	966	8	0,308

Nota. NA: Numero alélico. N: Cantidad de aislados por cada número alélico. F: Frecuencia de los números alélicos

Tabla 14
Frecuencia de secuencias tipo obtenidas

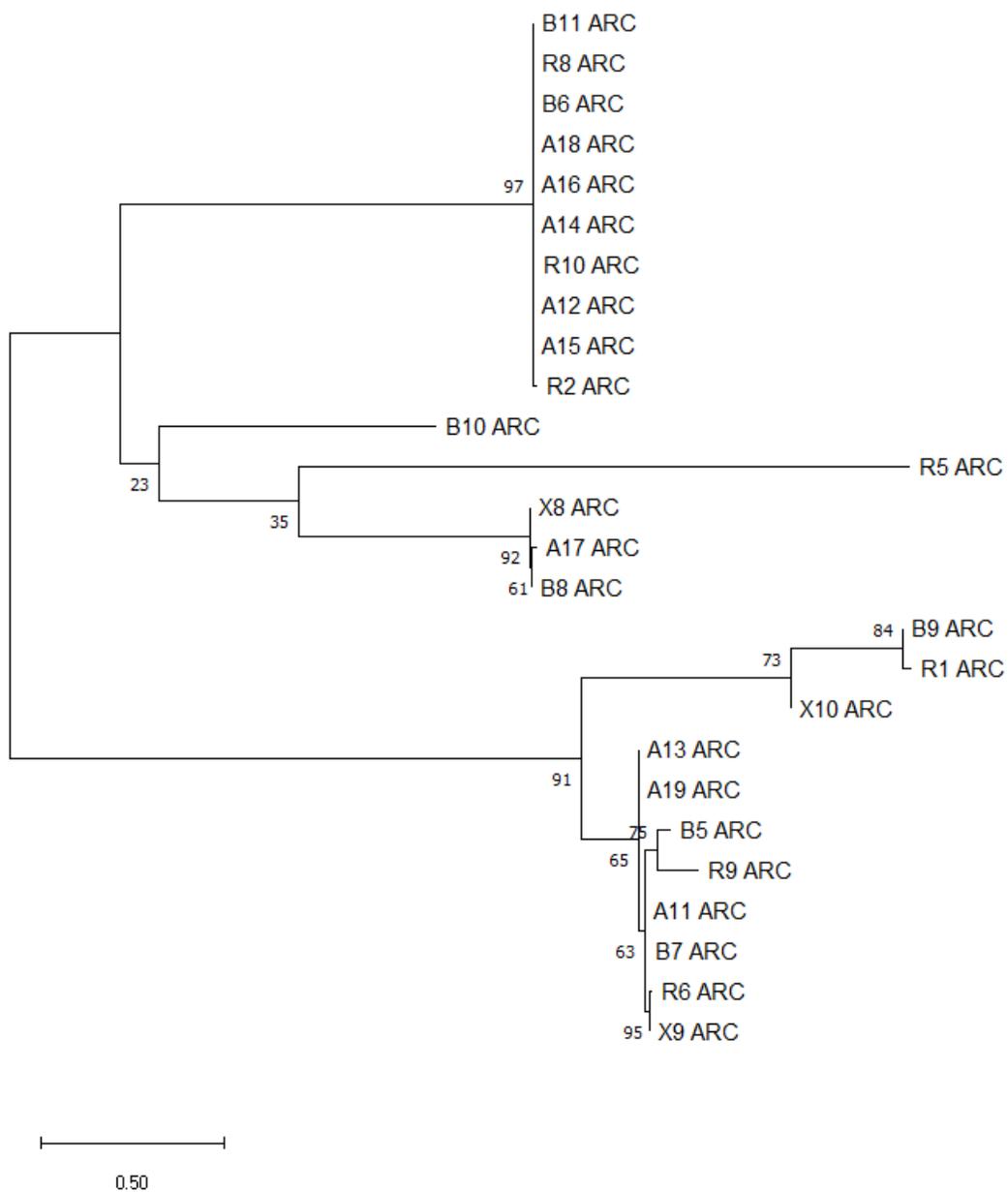
ST	N	F
ND1	13,00	0,500
ND2	1,00	0,038
ND3	2,00	0,077
ND4	6,00	0,231
ND5	1,00	0,038
ND6	1,00	0,038
ND7	1,00	0,038
ND8	1,00	0,038

Nota. ST: Secuencia tipo. N: Número de copias de todas las ST. F: Frecuencia de secuencias tipo

Análisis filogenéticos

Con el fin de evaluar las relaciones filogenéticas entre todas las cepas probadas, se analizaron los fragmentos de PCR para cada gen, así como las secuencias concatenadas de todos los fragmentos de PCR, para construir árboles filogenéticos basados en el mejor modelo de sustitución nucleotídica obtenido en MEGA.

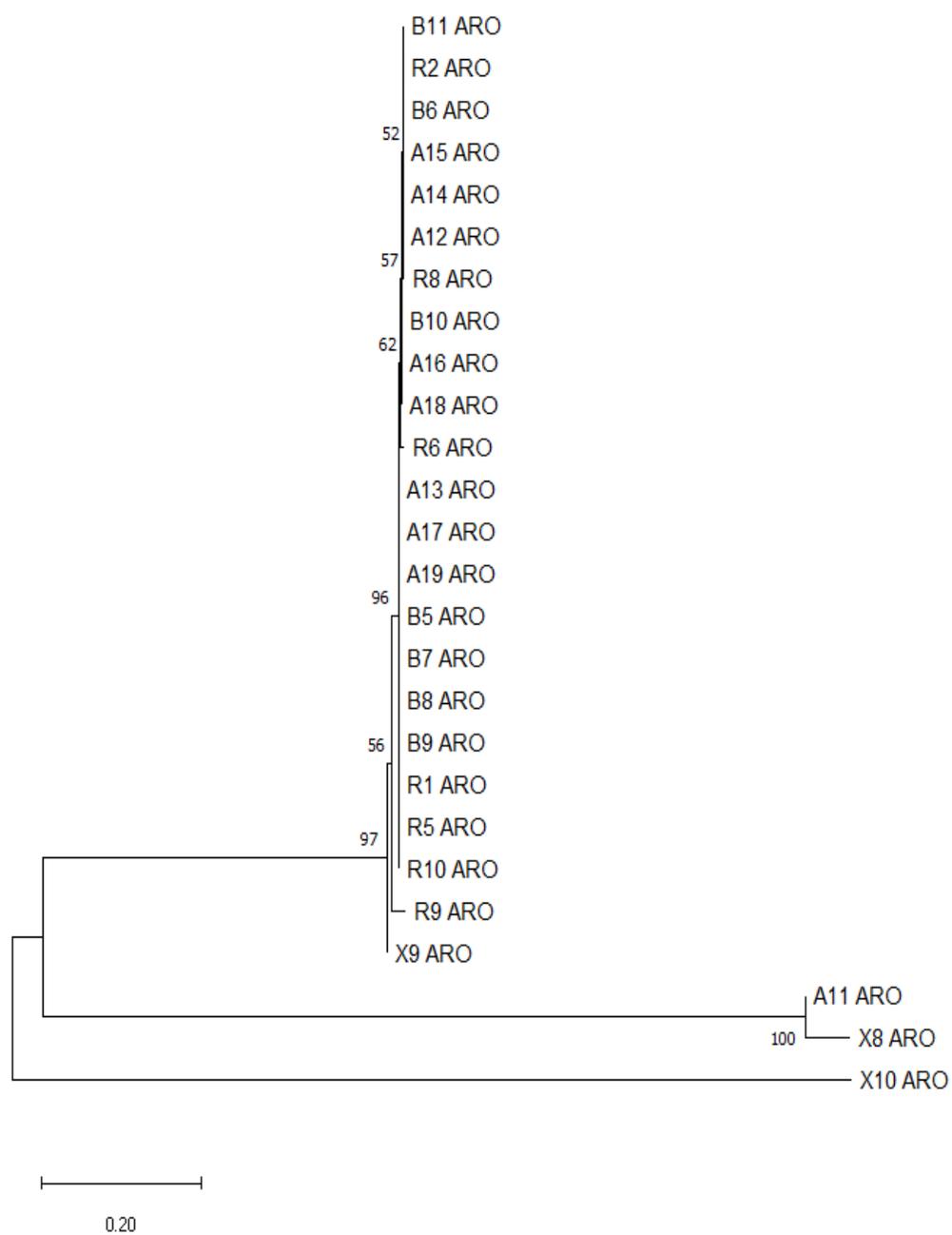
Figura 22

Árbol filogenético para gen *arcC*

Nota. Árbol ML realizado con modelo HKY y 500 Bootstraps

Figura 23

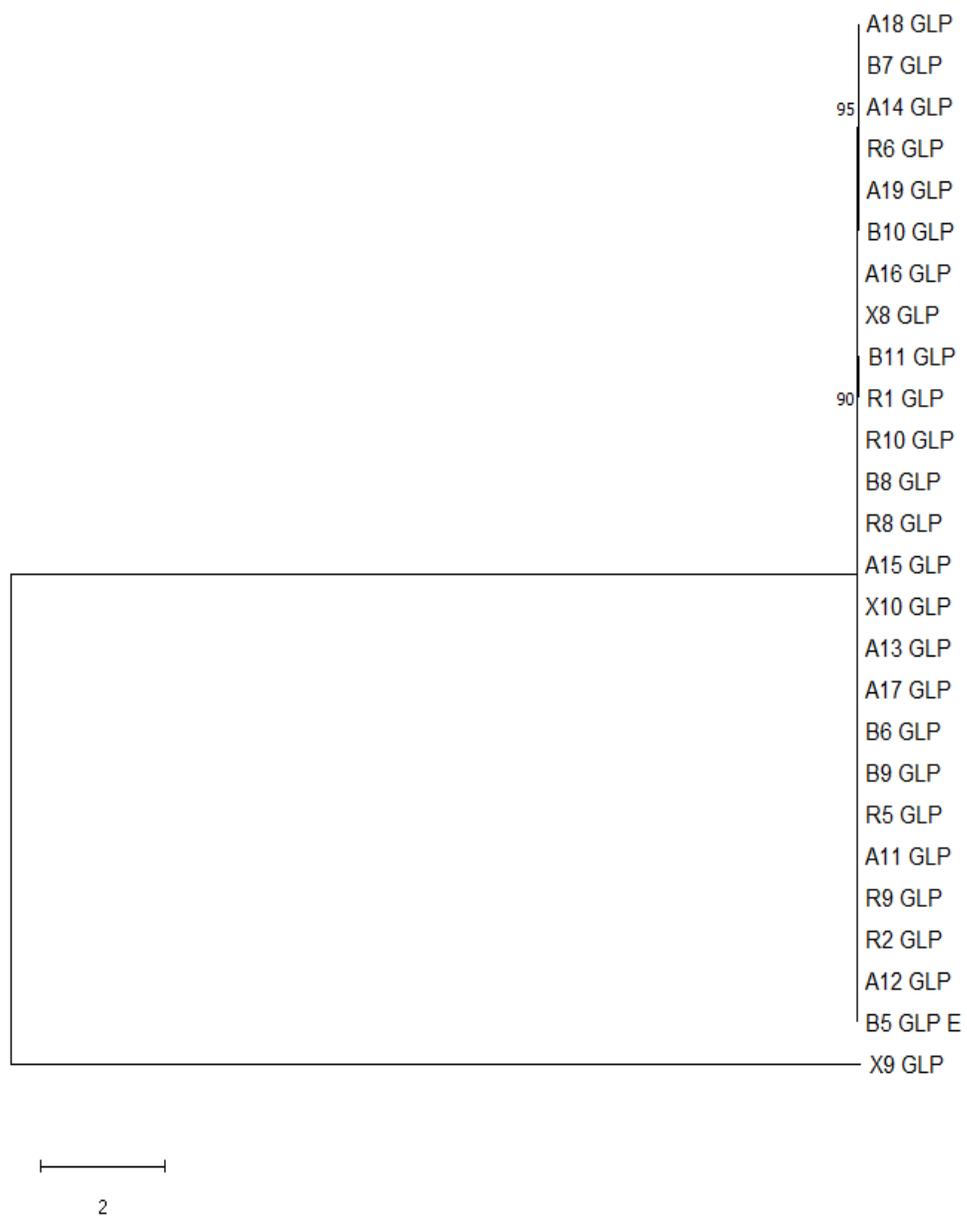
Árbol filogenético para gen *aroE*



Nota. Árbol ML realizado con modelo HKY y 500 Bootstraps

Figura 24

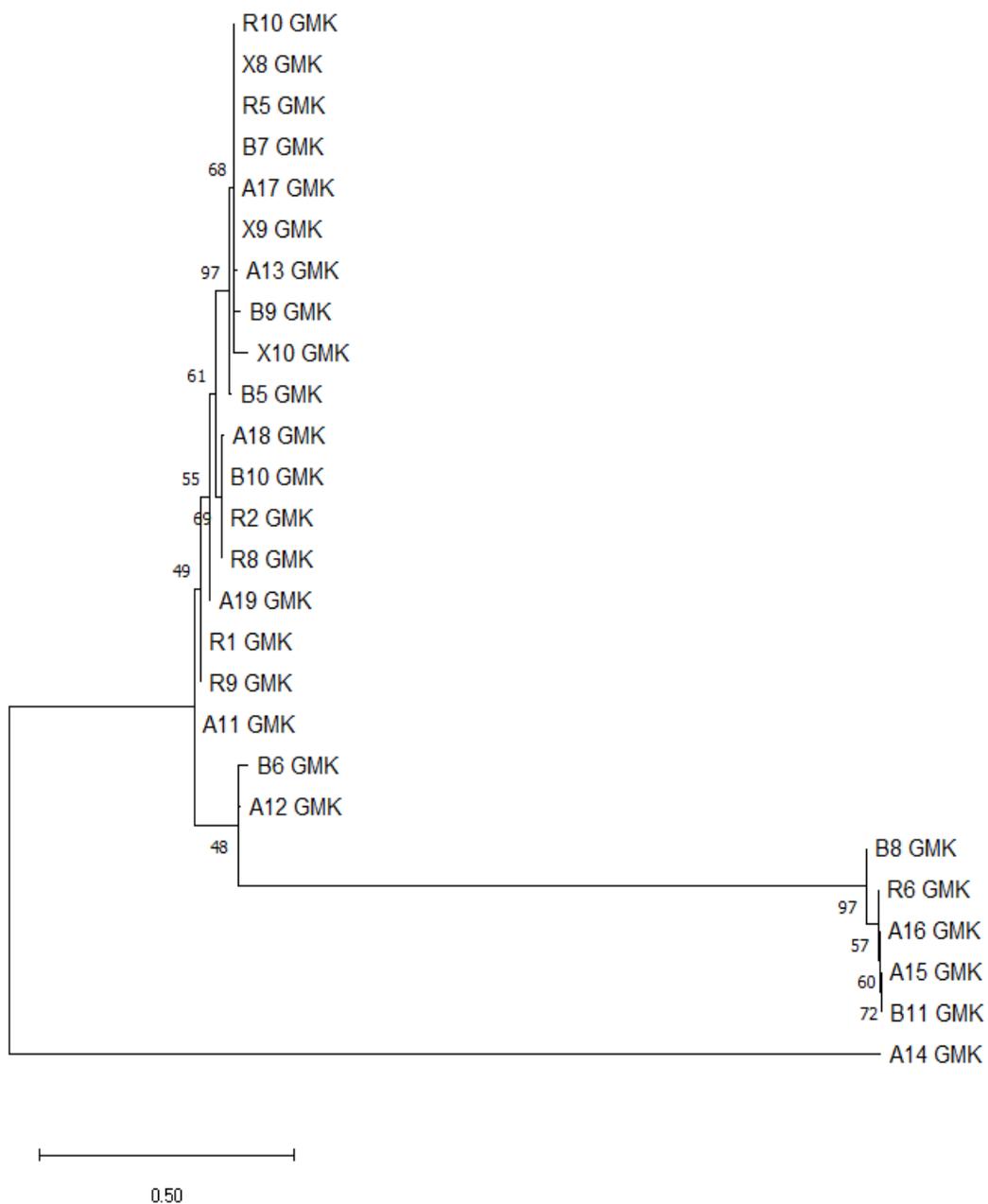
Árbol filogenético para gen *glpF*



Nota. Árbol ML realizado con modelo TN93+G y 500 Bootstraps

Figura 25

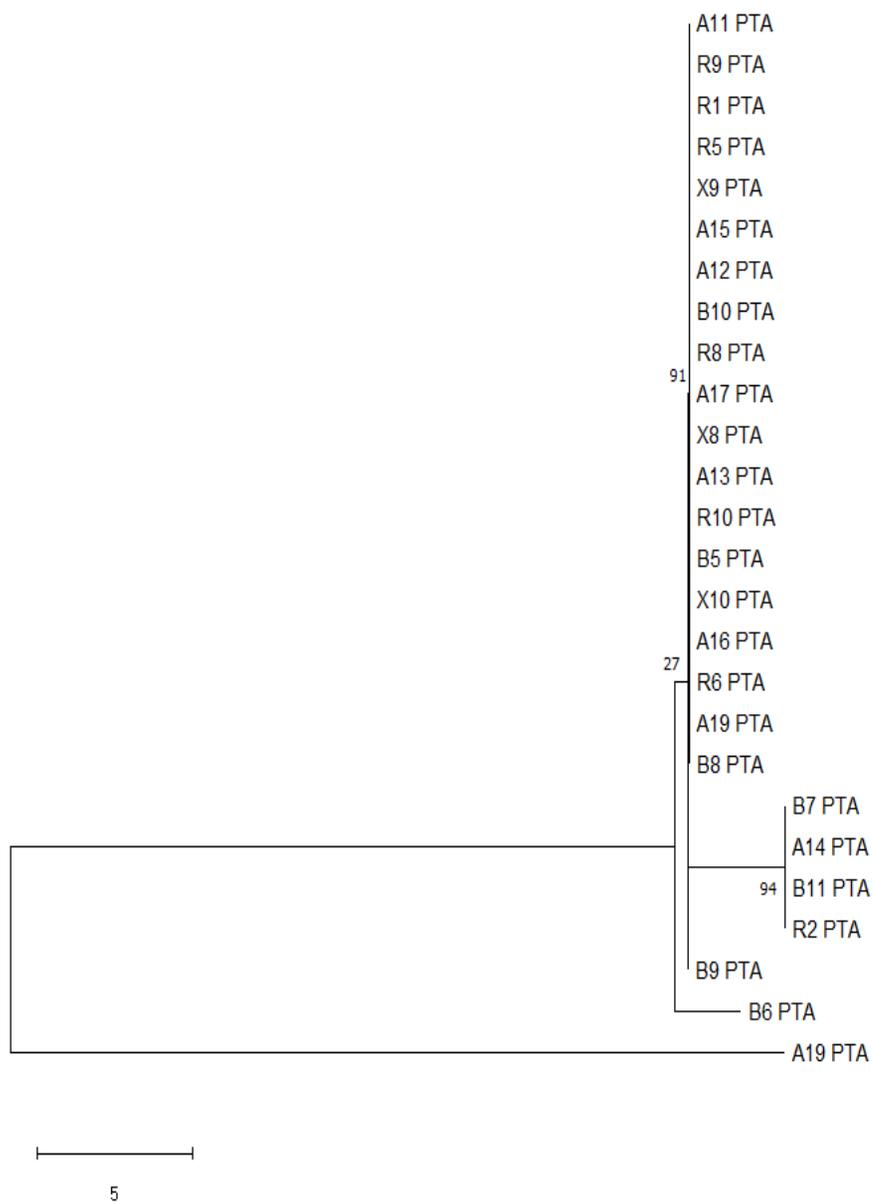
Árbol filogenético para gen *gmk*



Nota. Árbol ML realizado con modelo HKY y 500 Bootstraps

Figura 26

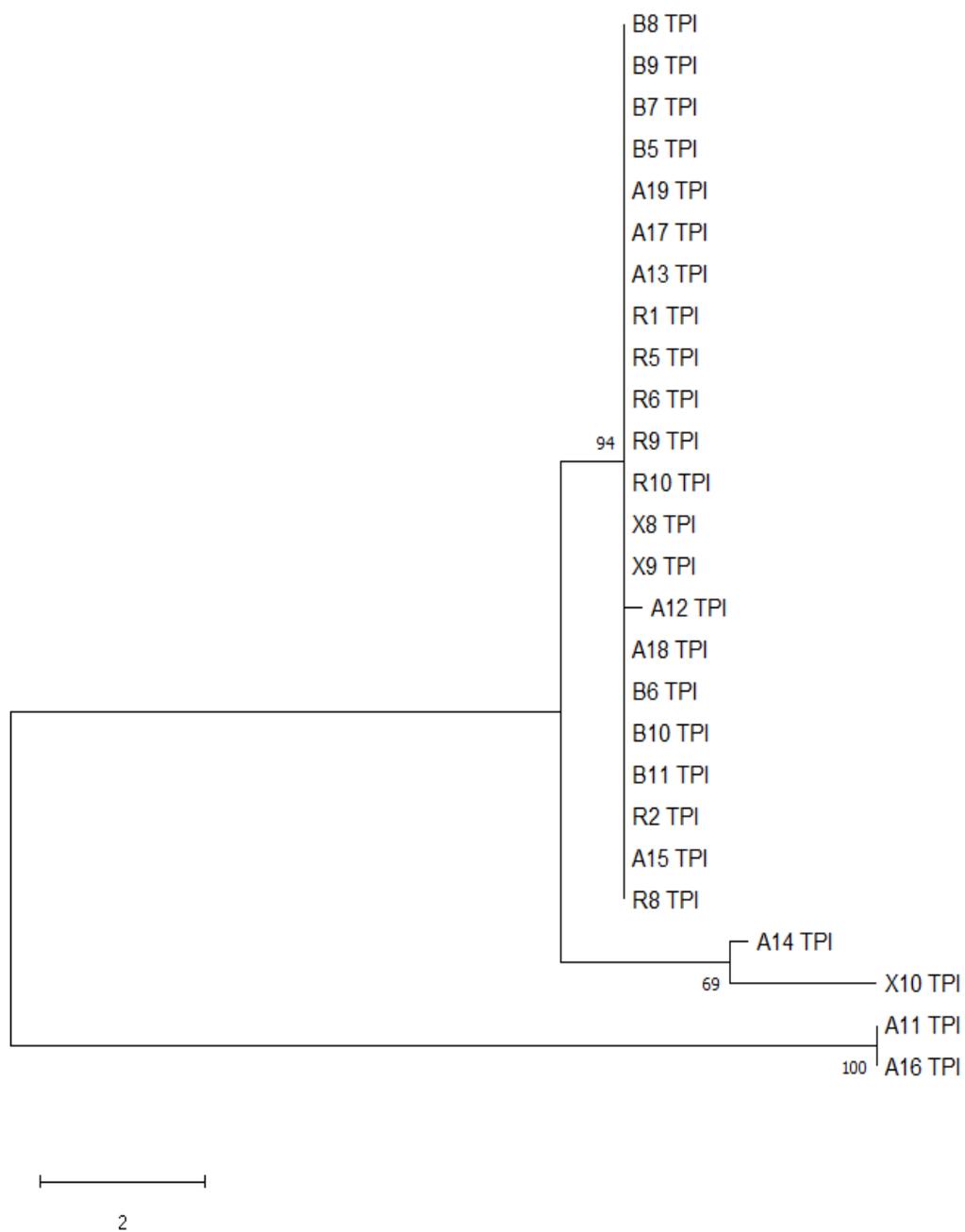
Árbol filogenético para gen *pta*



Nota. Árbol ML realizado con modelo GTR y 500 Bootstraps

Figura 27

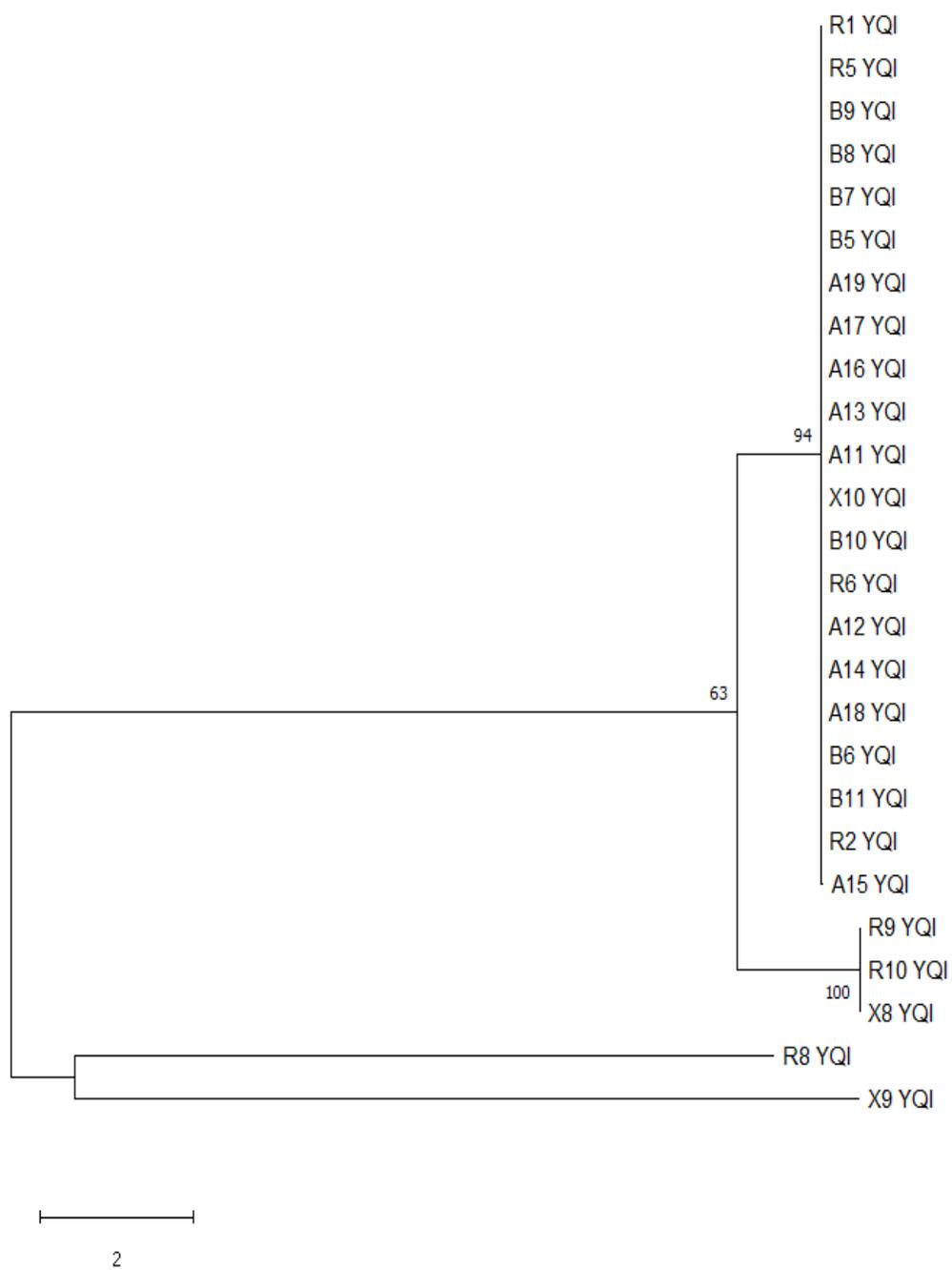
Árbol filogenético para gen *tpiA*



Nota. Árbol ML realizado con modelo T92 y 500 Bootstraps

Figura 28

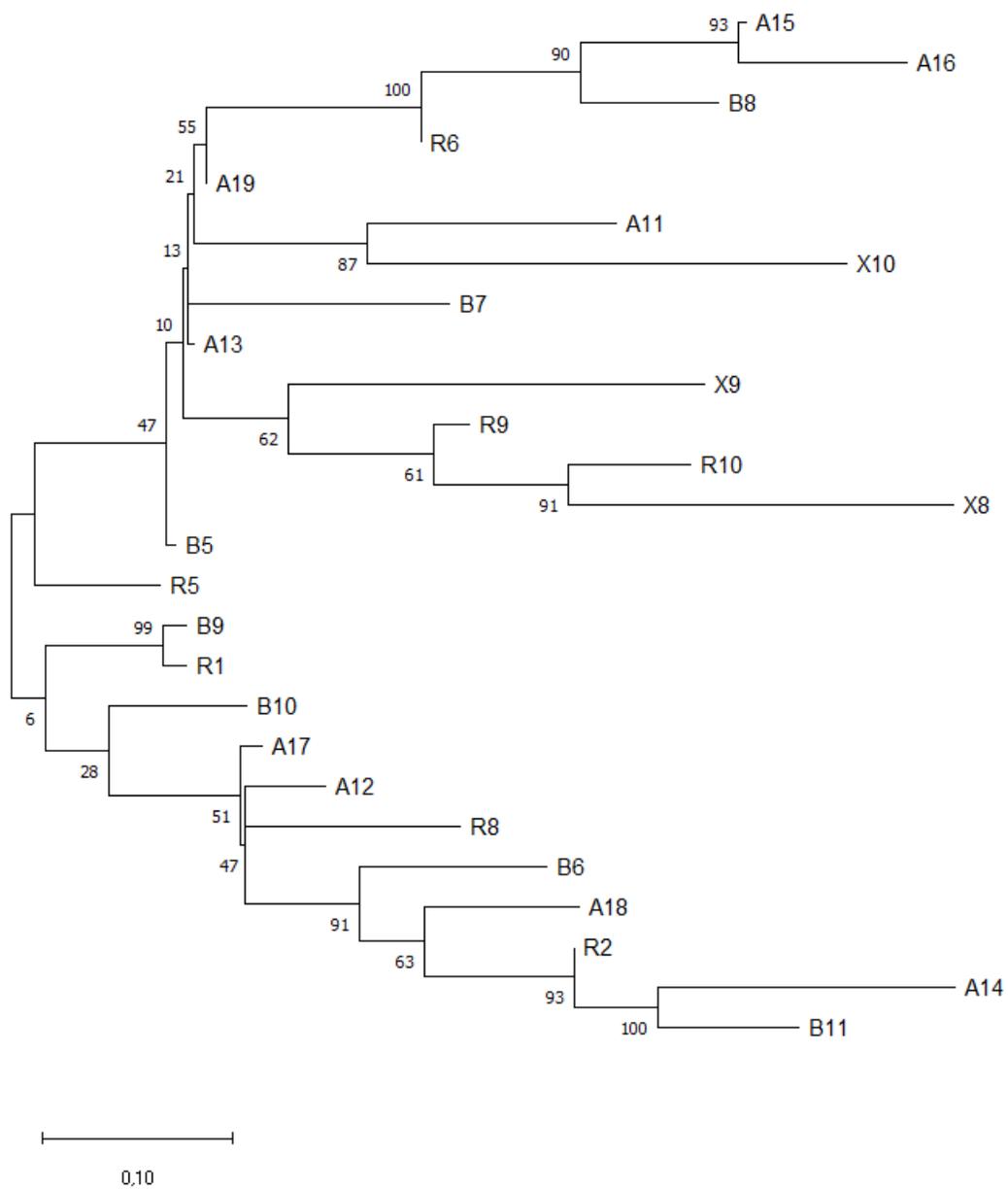
Árbol filogenético para gen *yqiL*



Nota. Árbol ML realizado con modelo HKY y 500 Bootstraps

Figura 29

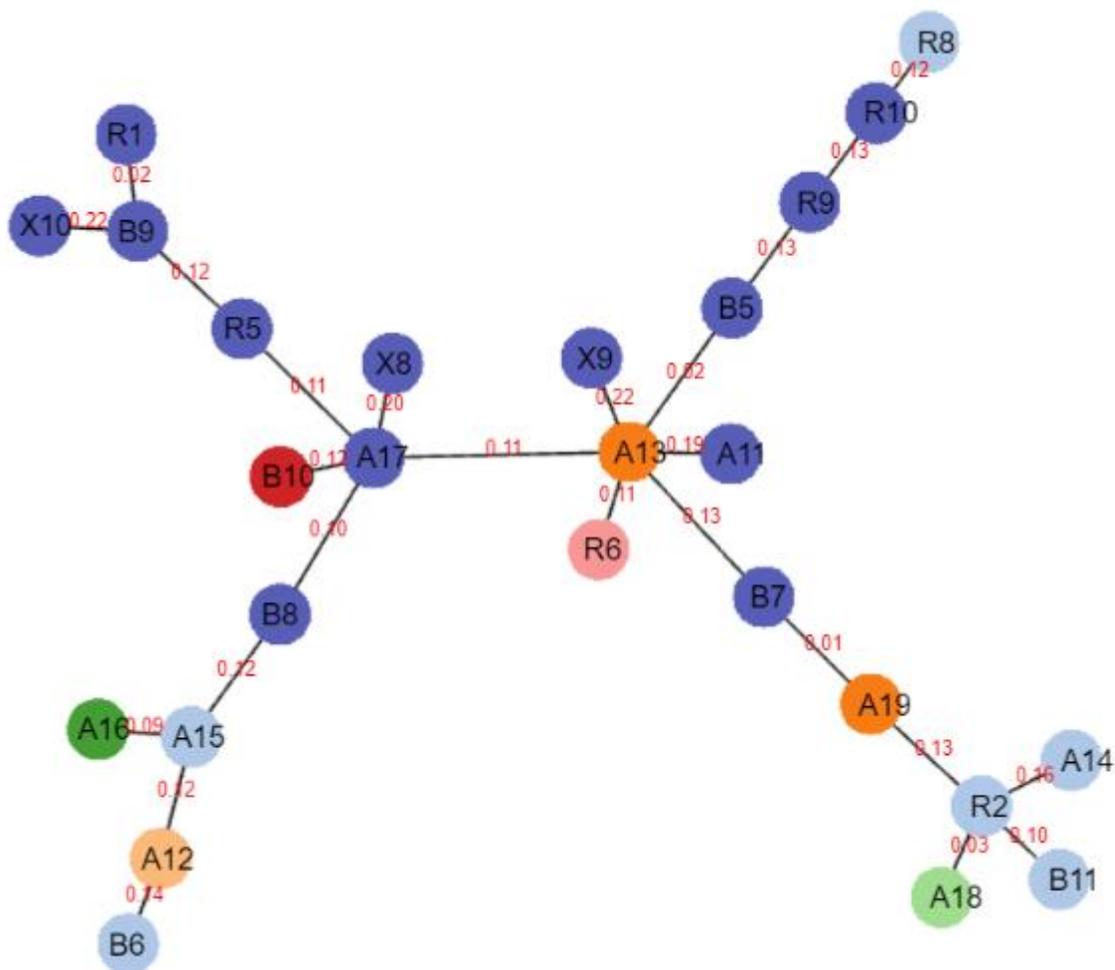
Árbol filogenético de secuencias concatenadas



Nota. Árbol ML realizado con modelo HKY+G+I y 500 Bootstraps

Figura 30

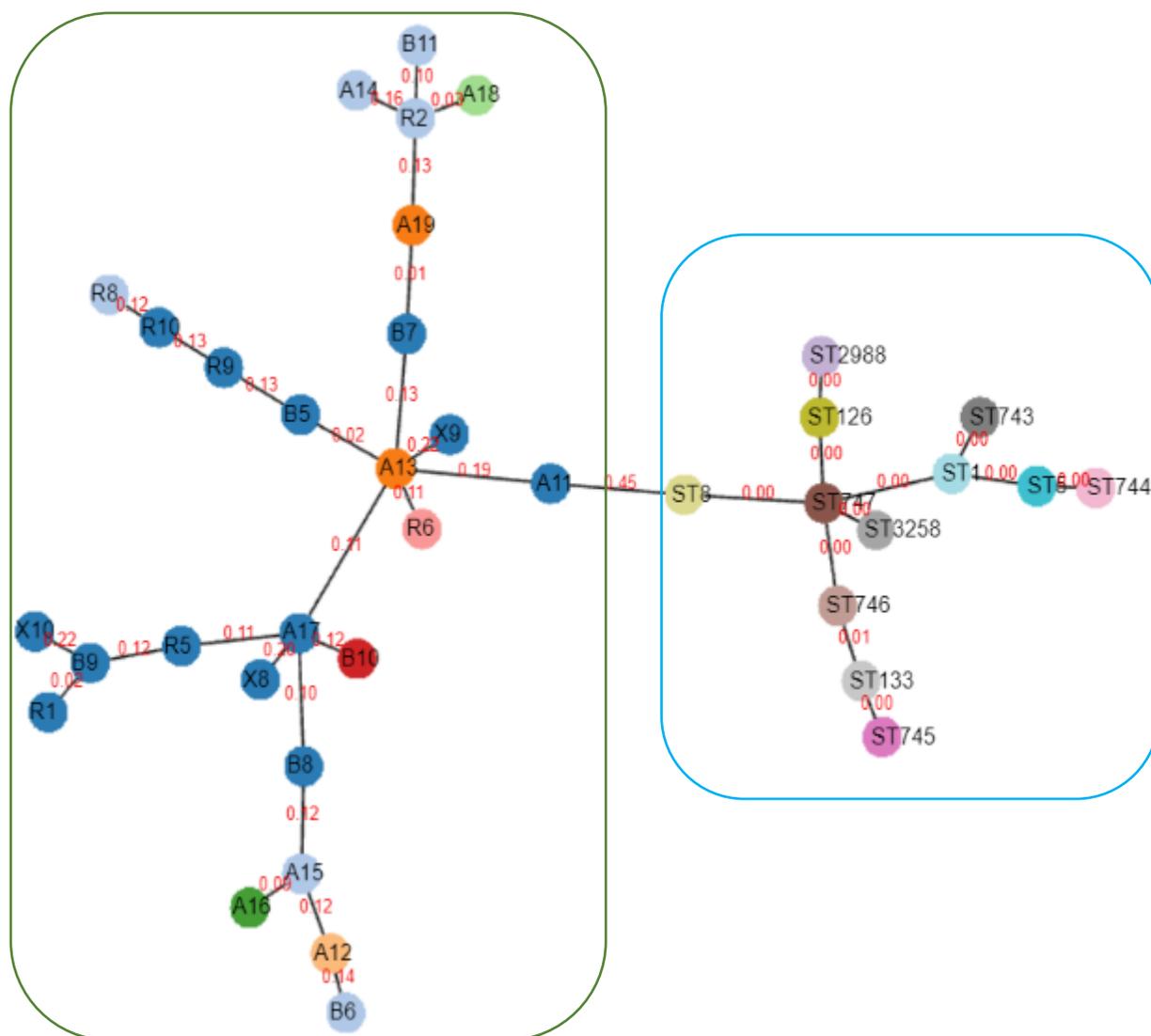
Árbol de mínima expansión de los 26 aislados de MRSA estudiados



Nota. Secuencias tipo agrupadas por colores, no se puede determinar complejos clonales específicos

Figura 31

Árbol de mínima expansión de los 26 aislados de MRSA estudiados incluyendo clones previamente reportados en América del Sur



Nota. Recuadro verde: 26 muestras del presente estudio. Recuadro celeste: Clones reportados en América del Sur y Ecuador

Capítulo V: Discusión

A nivel mundial *Staphylococcus aureus* ha sido descrito como el principal patógeno causante de infecciones adquiridas en hospitales (HA-MRSA) e infecciones adquiridas en la comunidad (CA-MRSA), además presenta tasas importantes de morbilidad y mortalidad (Algammal et al., 2020; Turner et al., 2019). En Ecuador, los hospitales no son ajenos a *S. aureus*, por su parte, Burbano et al. (2020), reportaron que un 47,83% de muestras procesadas a partir de infecciones cutáneas en pacientes del Hospital Provincial General “Ambato”, corresponden a cepas resistentes a diversos antibióticos incluyendo la meticilina, la oxalicina y varias penicilinas, demostrando así, la circulación de estas variantes en el país. Estos datos se corresponden con los de Zurita et al. (2016), quienes señalan una prevalencia del 46,97% de MRSA en estudios realizados en la ciudad de Quito.

En esta investigación, se recuperaron 32 muestras de *S. aureus* almacenadas en caldo infusión cerebro-corazón (BHI) suplementada con glicerol a -80°C. Si bien inicialmente se dispuso de 53 aislados (21 en TSA, 32 en BHI), su conservación a distintas temperaturas por periodos extensos en condiciones no idóneas, repercutió en la eficacia del restablecimiento de los cultivos. Esto se debe a que la manutención de bacterias a temperaturas por debajo de los 4°C induce la acumulación de mutaciones que trastornan la transcripción y la traducción de los genes. Esto se refleja en la alteración en el grosor de la pared celular y la reducción de la actividad enzimática, pero sobre todo, se debe recalcar el incremento en la permeabilidad de la membrana ocasionado por la deshidratación y el encogimiento celular lo que eventualmente permite el paso de nuevos solutos hacia la célula produciendo su muerte. Esto disminuye significativamente la proporción de aislados que pueden ser recuperados (Guo et al., 2020; Suo et al., 2018). Por ello, se recomienda no mantener a *S. aureus* a 4°C por más de una semana, aunque existen estudios en los que se la ha almacenado hasta ocho semanas bajo estas

condiciones (Onyango et al., 2012). Guo et al. (2020), también indican la factibilidad de la criopreservación bacteriana a -80°C en medios suplementados con glicerol, pues este componente evita la formación de cristales intracelulares evitando el daño por congelamiento mientras que Ermenlieva et al. (2021), señalan al medio BHI como la mejor opción para el almacenamiento de *S. aureus* por periodos extensos y en adición aluden que aplicar una temperatura de -80°C con este fin, es preferible a emplear temperaturas mayores pues incrementa el tiempo de conservación potencial. Por esta razón, la recuperación de todas las muestras que se encontraban en este medio resultó exitosa. En adición, el mantener a *S. aureus* en medios enriquecidos y sin presión antibiótica ocasiona la pérdida de factores de virulencia y de elementos móviles como *SCCmec* (Missiakas & Schneewind, 2013). Debido a lo mencionado previamente, se realizó la caracterización bioquímica y molecular de los aislados para verificar características fenotípicas propias de *S. aureus* además de la presencia de los genes: *nuc*, *16S* y *mecA*. Como se puede observar en la Figura 5, se comprobó el crecimiento de cepas con β -hemólisis, característica dada por un factor de virulencia importante de *S. aureus*, la hemolisina. En adición, se destacan al microscopio, las formas esféricas características agrupadas en racimos de tonos violeta (Gram positivas) propias de la bacteria en cuestión (Missiakas & Schneewind, 2013; Turista & Puspitasari, 2019).

Para la identificación molecular del componente de la subunidad menor de los ribosomas en procariontes, se analizan zonas conservadas del gen de RNA ribosomal, 16S; su uso es amplio debido a la gran cantidad de información disponible en bases de datos sobre su secuencia (Sune et al., 2020). El gen *nuc* por su parte, se ha empleado por mucho tiempo para la identificación de *Staphylococcus aureus*, este codifica la proteína termonucleasa, no obstante, para mayor precisión, se recomienda complementar su análisis con otros genes característicos ya que se ha reportado que *S. hyicus*, *S. intermedius* y *S. schleiferi* también presentan el gen,

derivando en identificaciones erróneas de *S. aureus* (Public Health England & National Health Service, 2020). En este estudio, se observó la ausencia del gen *nuc* en dos muestras, este efecto ha sido descrito previamente por Hoegh et al. (2014), y se explica debido a la presencia de deleciones parciales del gen en casos particulares. Finalmente, el gen *mecA*, se analizó pues es el causante de la resistencia a meticilina, al codificar PBP2a con baja afinidad por β -lactámicos (Preeja et al., 2021).

El sistema MLST se validó en el año 2000 por Enright y sus colaboradores quienes analizaron un total de 14 genes metabólicos de los que eligieron 7: *arcC* que codifica carbamato quinasa, *aroE* que codifica shikimato deshidrogenasa, *glpF* que codifica glicerol quinasa, *gmk* que codifica guanilato quinasa, *pta* que codifica fosfato acetiltransferasa, *tpiA* que codifica triosafosfato isomerasa e *yqiL* que codifica acetil coenzima A acetiltransferasa. En el presente trabajo, se evidenció una mayor variabilidad de los genes *arcC*, *aroE* e *yqiL* (Tabla 13) pues fueron aquellos con mayor cantidad de números alélicos (5, 4 y 4 respectivamente). Por otra parte, el gen más conservado fue *glpF*, con 2 números alélicos y uno de ellos representando a 25 de las 26 muestras. Estas circunstancias se confirman además gracias a los árboles filogenéticos realizados (Figura 22- Figura 28), en los que se denota la relación evolutiva de las variantes alélicas encontradas a nivel individual. Al igual que en el artículo de Enright et al. (2000), los fragmentos de genes más diversos corresponden a *arcC* y *aroE* y los fragmentos más uniformes fueron los de *glpF*, este patrón se ha mantenido con el paso del tiempo, como se demuestra en el análisis realizado por Polveiro et al. (2021), donde a *aroE* y *yqiL* son los genes con mayor diversidad y polimorfismo con respecto al resto y *glpF* es el de menor tasa de mutación, situación que también se puede corroborar por la cantidad de variantes existentes para cada gen en la base de datos de PubMLST.

Acker et al. (2019) y Salazar et al. (2020) demostraron que los polimorfismos en genes metabólicos de *S. aureus* son inesperadamente comunes y se generan por la adaptación de la bacteria al ambiente en el que se encuentra con la finalidad de sobrevivir al estrés, mantener su patogenicidad o adecuar su crecimiento. Asimismo, tomando en consideración que las muestras empleadas han pasado por varias instancias distintas desde la toma de la muestra hasta su criopreservación y el tiempo transcurrido hasta la realización del presente estudio, el tener mutaciones puntuales en las muestras es previsible. En este aspecto las mutaciones obtenidas (Figura 16 – Figura 21), fueron analizadas con la finalidad de determinar si generarían proteínas distintas a las esperadas con respecto a su gen metabólico correspondiente. No obstante, para el caso del nucleótido 500 del gen *pta* en la muestra A18, fue evidente la presencia de una mutación sinónima, es decir, genera el mismo aminoácido por lo que no afecta a la proteína final. Sin embargo, se recomienda realizar estudios posteriores pues se ha demostrado que a nivel molecular las mutaciones sinónimas pueden alterar el proceso de splicing y la efectividad de la traducción (Chu & Wei, 2019). Distinto a lo observado previamente, las mutaciones en el nucleótido 173 del gen *aroE* en la muestra X8 y en el nucleótido 326 del gen *pta* en la muestra R1, al ser traducidas, presentan una variación en los aminoácidos originados en el primer caso de isoleucina (Ile) a metionina (Met) y en el segundo de treonina (Thr) a serina (Ser) (Figura 17, Figura 19), demostrando ser mutaciones no sinónimas. Pese a este fenómeno, al realizar la revisión mediante BLAST de la mutación en el gen *aroE*, esta condujo con una similitud de 99,23% a la identificación de la proteína shikimato deshidrogenasa. En el caso de la mutación hallada en el gen *pta*, se obtuvo con un 98,89% la proteína fosfato acetiltransferasa, como se esperaba en cada caso, los alineamientos fueron análogos con las proteínas metabólicas pertinentes. La profundización en el comportamiento de estas mutaciones es relevante dado que se ha constatado que también inciden en la tasa de supervivencia y la tasa de acidificación

extracelular durante la infección al hospedero, más aún en la formación de biofilms

(Gabryszewski et al., 2019; Kim et al., 2021).

Análogamente, se detectaron 8 ST nuevos, generados por las combinaciones alélicas de los 7 genes de cada muestra. Este resultado no es improbable pues según la información del software empleado (PubMLST) los genes *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpiA* e *yqiL* poseen 862, 1037, 908, 572, 871, 806 y 973 variantes alélicas respectivamente, datos que si se tratan como permutaciones nos otorgan un total de 3,17E20 posibles ST, sin embargo, en la página se tienen apenas 7345 ST descritos (Jolley et al., 2018). Al igual que las mutaciones presentadas previamente, la aparición de nuevas variantes alélicas responden a un proceso evolutivo que le permite a la bacteria adaptarse a los factores epigenéticos que la rodean para sobrevivir (Bobay & Ochman, 2017). Este hecho junto con la baja cantidad de aislados reportados de la zona de América del Sur (393 en total, siendo 1 de Ecuador) conllevan a la aparición no solo de nuevos ST sino también de complejos clonales y tasas de variación alélica distintas que se recomiendan investigar a largo plazo con la ayuda de secuenciación de nueva generación (NGS). Esta tecnología ofrece mayor resolución, aportando características sobre la diversidad del resto del genoma de la bacteria, lo que permite una mejor caracterización de esta (Page et al., 2017; Sabat et al., 2013). Se recomienda además realizar un nuevo análisis sobre la cantidad y variedad de ST circulantes en el país empleando un mayor número de muestras y tomando en consideración otras zonas del territorio nacional, con el objeto de enfocar la investigación hacia la genética poblacional.

Durante el estudio también se empleó la base de datos del Centro de Epidemiología Genómica (https://bitbucket.org/genomicepidemiology/mlst_db/src/master/) de la Universidad Técnica de Dinamarca y se lo comparó con la base de PubMLST. Las secuencias con los mismos números alélicos de ambas se alinearon con MEGA-X, se observó una alta variabilidad entre las

mismas, es decir, los alelos no se correspondían, por lo que se concluye que ambas instituciones manejan codificaciones diferentes lo que imposibilita su uso para comprobaciones. Cabe destacar que muchos de los programas de identificación de STs como ARIBA, BioNumerics, MLSTcheck, stringMLST, SeqSphere+ y SRST2 poseen scripts para descargar su información desde PubMLST, además algunos no contemplan a *S. aureus* dentro de sus paquetes y otros son de tipo comercial por lo que su acceso es limitado (Page et al., 2017).

Se ha reportado que en América del Sur circulan aislamientos predominantemente de los serotipos ST-1, ST-5 y ST-8 (Rodríguez et al., 2010). Una de las características principales evidenciadas en las últimas décadas con respecto a estos clones de MRSA es la dispersión de cepas de origen comunitario por sobre las cepas hospitalarias y la adquisición de mayor virulencia por parte de estas al mejorar la expresión de sus sistemas de regulación (Chávez et al., 2015). Como ejemplo, USA300 es un clon CA-MRSA actualmente considerado hiper virulento y que se esparce de manera epidémica en la población. Las variantes latinoamericanas se distinguen de USA300 por poseer el elemento SCCmec IVc y un elemento genético móvil que le confiere resistencia ante el cobre y el mercurio (Strauß et al., 2017).

Así mismo, los estudios realizados en estos países demuestran la aparición de nuevas combinaciones alélicas como es el caso de Monteiro et al. (2019), quienes hallaron 9 ST nuevos en Brasil. En Chile predomina ST8, pese a esto, el Instituto de Salud Pública de Chile (2013), también encontró una nueva combinación alélica no determinada previamente. En cambio, en Argentina dos estudios encontraron una predominancia de ST5 y ST30 y en cada uno se hallaron cepas no tipificables (Tomatis et al., 2018). En el caso específico de Ecuador, se han reportado secuencias tipo ST8 (relacionadas con USA300), ST45, ST30, ST5 y ST22 y clones epidémicos como el Brasileño (ST239-MRSA-III), el pediátrico (ST5-MRSA-IV) y el clon Nueva York/Japón (ST5-MRSA-II) (Zurita et al., 2016). Por esta razón se decidió comparar las secuencias de estas

cepas con las analizadas en el presente trabajo realizando un árbol de mínima expansión (Figura 31), en el que se determinó que no existe una relación clonal cercana entre las muestras de este estudio con los ST previamente reportados, siendo ST8 el más cercano al grupo de estudio.

Otra característica de las muestras investigadas que llama la atención es que no se las ha podido relacionar con complejos clonales específicos (Figura 30-Figura31), según Arévalo (2018), esto indica que las cepas encontradas han traspasado las barreras de lo hospitalario encontrándose además a nivel comunitario con características dependientes de diversas condiciones del hospedero portador como: edad, tratamientos previos, condiciones preexistentes, entre otros. Actualmente existen datos de que en Brasil, Ecuador, Venezuela y Colombia alrededor del 27% de aislamientos de MRSA corresponden a CA-MRSA, lo que de seguir en aumento, generaría una mayor cantidad de variantes posiblemente multirresistentes y que se presentarían con mayor frecuencia en la población (Cabrejos et al., 2021).

Pattengale et al. (2010), demostraron que la cantidad de réplicas de Bootstrap (BS) necesarias para obtener árboles de máxima verosimilitud (MLT) con valores de soporte robustos y practicidad computacional son 500, es por esto que este fue el valor empleado para este estudio. En los árboles filogenéticos (Figura 22-Figura 29), se evidencian las relaciones evolutivas de cada gen y también del conjunto de muestras en sí, denotando una gama de taxones en el último caso, lo que lleva a inferir la existencia de una gran cantidad de eventos evolutivos independientes surgidos dentro de la historia evolutiva de cada muestra (Khan et al., 2008). A pesar de que en este trabajo las muestras seleccionadas no pudieron catalogarse dentro de grupos clonales específicos se puede observar la formación de agrupaciones en la Figura 30 generada mediante goeBURST. Si bien estos conjuntos no se relacionan evolutivamente según el MLT (Figura 29), esto se debe al tipo de análisis utilizado por cada algoritmo. En el caso de MSTree se crean árboles con base en los perfiles alélicos y representando la evolución con el

mínimo de eventos posibles, por su parte MLT empleó como datos de entrada las secuencias concatenadas del genoma, esta variación en el tipo de remuestreo afecta la topología presentada por cada uno (Arévalo, 2018).

Capítulo VI: Conclusiones y Recomendaciones

Se estandarizó el sistema MLST para la tipificación de aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA) provenientes de infecciones sistémicas en dos hospitales de Quito, empleando la técnica de PCR end-point para los genes metabólicos *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpiA* e *yqiL*.

En la purificación de los productos de la PCR de genes metabólicos se logró optimizar la cantidad de muestra necesaria para el kit PureLink® Quick PCR Purification Kit™ alcanzando alta eficiencia con volúmenes de DNA de apenas 10uL. Para el proceso de secuenciación Sanger se optimizó la reacción de secuenciación cíclica empleando 0,5µL de BigDye™ Terminator v3.1 por reacción.

En el presente estudio se emplearon varias herramientas bioinformáticas, siendo estas Primer Blast para la determinación del tamaño de los genes metabólicos; Geneious Prime 2020.0.4 y SnapGene para análisis preliminares y curación de las secuencias obtenidas; PubMLST para la determinación de variantes alélicas y secuencias tipo, MEGA para realizar los árboles filogenéticos y PHYLOViz 2.0 para los árboles de mínima expansión.

La tipificación molecular de los 26 aislados determinó la presencia de ocho nuevas secuencias tipo circulantes en el país, sin complejos clonales definidos y sin relación significativa con clones previamente descritos en la zona. Además, demostró la existencia de nuevas variantes alélicas entre las muestras evidenciada gracias a las mutaciones encontradas en alelos de los genes *aroE* y *pta*.

Se recomienda realizar el reporte de los perfiles alélicos y las mutaciones observadas para obtener sus respectivos números de identificación. Igualmente, extender la investigación

presente con un mayor número de muestras empleando NGS para relacionarlo con la técnica de Análisis Multilocus y finalmente analizar la incidencia de factores clínico epidemiológicos en la tasa de mutación de los genes metabólicos descritos para MLST.

Bibliografía

- Abouelfetouh, A. (2017). The Status of Methicillin Resistance Among Egyptian *Staphylococcus aureus* Isolates: An Overview. *Infectious Disorders - Drug Targets*, 17(1), 67–69. <https://doi.org/10.2174/1871526516666160802111200>
- Acker, K. P., Wong Fok Lung, T., West, E., Craft, J., Narechania, A., Smith, H., O'Brien, K., Moustafa, A. M., Lauren, C., Planet, P. J., & Prince, A. (2019). Strains of *Staphylococcus aureus* that Colonize and Infect Skin Harbor Mutations in Metabolic Genes. *IScience*, 19, 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.07.037>
- Aguayo, A. (2020). *Caracterización del cassette cromosómico estafilocócico SCCmec en aislados de Staphylococcus aureus resistente a la meticilina con fenotipo comunitario*.
- Aguayo, A. (2020). *Caracterización del cassette cromosómico estafilocócico SCCmec en aislados de Staphylococcus aureus resistente a la meticilina con fenotipo comunitario*.
- Aguayo, A., González, G., Quezada, M., Mella, S., Riedel, G., Opazo, A., Bello, H., & Domínguez, M. (2018). Bases moleculares de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. *Revista Chilena de Infectología*, 35(1), 7–14. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v35n1/0716-1018-rci-35-01-0007.pdf>
- Alberto Díaz-Sánchez, A., Martínez-Marrero, S., & Corona-González, B. (2018). Artículo Reseña Tipificación Multilocus de secuencias aplicada a la caracterización molecular de hemoparásitos en el ganado bovino Multi-locus sequence typing applied to the molecular characterization of hemoparasites in cattle. In *Rev. Salud Anim* (Vol. 40, Issue 1).
- Algammal, A. M., Hetta, H. F., Elkelish, A., Alkhalifah, D. H. H., Hozzein, W. N., Batiha, G. E. S., Nahhas, N. el, & Mabrok, M. A. (2020). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. *Infection and Drug Resistance*, 13, 3255–3265. <https://doi.org/10.2147/IDR.S272733>
- Applied Biosystems. (2016). *DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis Chemistry Guide* (3rd ed., Vol. 1). Thermo Fisher. https://www.ramaciotti.unsw.edu.au/sites/default/files/2019-04/sequencing_handbook_FLR.pdf
- Applied Biosystems. (2016). *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*. Thermo Fisher. https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0015666_BigDyeTerminator_V3_1_CycleSeq_QR.pdf? ga=2.9383996.82529631.1642643657-114084802.1629992271https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_081527.pdf

- Arévalo, J. (2018). *Genotipificación de Klebsiella Pneumoniae mediante el análisis de secuencias de Locus Múltiples (MLST) en una colección de aislados clínicos provenientes de infecciones sistémicas de dos hospitales de referencia del Ecuador*. [Tesis de Grado, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/14116>
- Argudín, M. Á., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2010). Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*, 2(7), 1751–1773. <https://doi.org/10.3390/toxins2071751>
- Azarian, T., Daum, R. S., Petty, L. A., Steinbeck, J. L., Yin, Z., Nolan, D., Boyle-Vavra, S., Hanage, W. P., Salemi, M., & David, M. Z. (2016). Intra-host Evolution of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 Among Individuals With Reoccurring Skin and Soft-Tissue Infections. *Journal of Infectious Diseases*, 214(6), 895–905. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw242>
- Barrios López, M., Conejo, P. R., & Chaves Sánchez, F. (2012). *Características epidemiológicas, clínicas y microbiológicas de las infecciones por Staphylococcus aureus adquirido en la comunidad en pediatría*. [Tesis de Grado, Universidad Complutense de Madrid]. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/17148/1/T34046.pdf>
- Biomatters Ltd. (2021, November 16). *Geneious Prime 2022.0 User Manual*. Geneious Prime. <https://assets.geneious.com/documentation/geneious/GeneiousPrimeManual.pdf>
- Blanc, D. S., Francioli, P., & Hauser, P. M. (2002). Poor value of pulsed-field gel electrophoresis to investigate long-term scale epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 2(2), 145–148. [https://doi.org/10.1016/S1567-1348\(02\)00093-X](https://doi.org/10.1016/S1567-1348(02)00093-X)
- Bobay, L.-M., & Ochman, H. (2017). Impact of Recombination on the Base Composition of Bacteria and Archaea. *Molecular Biology and Evolution*, 34(10), 2627–2636. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx189>
- Brown, A. F., Leech, J. M., Rogers, T. R., & McLoughlin, R. M. (2014). *Staphylococcus aureus* Colonization: Modulation of Host Immune Response and Impact on Human Vaccine Design. *Frontiers in Immunology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00507>
- Bukowski, M., Wladyka, B., & Dubin, G. (2010). Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins*, 2(5), 1148–1165. <https://doi.org/10.3390/toxins2051148>
- Burbano, D., González, A., Araujo, L., & Cruz, R. (2020). Microorganismos más frecuentes en infecciones cutáneas en el Hospital Provincial General Ambato. *Revista Eugenio Espejo*, 14(2), 19–29. <https://doi.org/10.37135/ee.04.09.05>
- Cabrejos, L., Vives, C., Inga, J., Astocondor, L., Hinojosa, N., & García, C. (2021). Frecuencia de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente adquirido en la comunidad en un hospital de tercer nivel en Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 38(2), 313–317. <https://doi.org/10.17843/rpmpes.2021.382.6867>

- Cardenas, P. A., Alarcón, M., Narvaez, I., Salazar, R., Falconí, G., Espinel, M., & Trueba, G. (2013). *Staphylococcus aureus* outbreak in the intensive care unit of the largest public hospital in Quito, Ecuador. *International Microbiology*, *16*(2), 81–86. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.182>
- Cardozo, Á. M., Poutou, R. A., Carrascal, A. K., Ramón, L. F., & Zambrano, D. C. (2013). Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*. *Universitas Scientiarum*, *18*(2), 203. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC18-2.egcp>
- Carmona, C., Talavera, L., García, F., Orozco, A., & Valdez, J. (2012). NiSspa: software de código abierto para la caracterización de aislados de *Staphylococcus aureus* por spa-typing para epidemiología molecular. *Revista de La DES Ciencias Biológico Agropecuarias*, *14*(2), 30–36.
- Cepas, V., & Soto, S. M. (2020). Relationship between Virulence and Resistance among Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics*, *9*(10), 719. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100719>
- Cervantes-García, E., García-González, R., & María Salazar-Schettino, P. (2014). Importancia de *Staphylococcus aureus* metilicina resistente intrahospitalario y adquirido en la comunidad. In *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* (Vol. 61, Issue 4). www.medigraphic.com/patologiaclinicawww.medigraphic.org.mx
- Chávez, M., Erazo, N. C., Reina, D. A., & Esparza, M. (2015). Métodos de tipificación y epidemiología molecular de *Staphylococcus aureus* con resistencia a la metilicina. *Biosalud*, *14*(2), 81–90. <https://doi.org/10.17151/biosa.2015.14.2.8>
- Chavez, M., & Martinez, A. (2019). Typification Methods and Molecular Epidemiology of *Staphylococcus aureus* with Methicillin Resistance. In *Staphylococcus Aureus*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76442>
- Chen, N., & Yun, L. (2006). DNA recovery from agarose gels with a simple centrifuge-driven Sephadex filtration. *Forestry Studies in China*, *8*(1), 32–34. <https://doi.org/10.1007/s11632-006-0006-7>
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, *12*(1), 547–569. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>
- Chu, D., & Wei, L. (2019). Nonsynonymous, synonymous and nonsense mutations in human cancer-related genes undergo stronger purifying selections than expectation. *BMC Cancer*, *19*(1), 359. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5572-x>
- Cong, Y., Yang, S., & Rao, X. (2020). Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. *Journal of Advanced Research*, *21*, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.10.005>

- Deresinski, S. (2005). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Evolutionary, Epidemiologic, and Therapeutic Odyssey. *Clinical Infectious Diseases*, 40(4), 562–573. <https://doi.org/10.1086/427701>
- Dinges, M. M., Orwin, P. M., & Schlievert, P. M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(1), 16–34. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.1.16-34.2000>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Edwards, A. M., Bowden, M. G., Brown, E. L., Laabei, M., & Massey, R. C. (2012). *Staphylococcus aureus* Extracellular Adherence Protein Triggers TNF α Release, Promoting Attachment to Endothelial Cells via Protein A. *PLoS ONE*, 7(8), e43046. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043046>
- Enright, M. C., Day, N. P., Davies, C. E., Peacock, S. J., & Spratt, B. G. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1008–1015. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.3.1008-1015.2000>
- Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H., & Spratt, B. G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(11), 7687–7692. <https://doi.org/10.1073/pnas.122108599>
- Ermenlieva, N., Georgieva, E., Tsankova, G., Todorova, T., & Mihaylova, S. (2021). suggestion for an optimal model for *E.coli*, *S. aureus* and *C. albicans* preservation at a storage temperature in the range of 4°C to -20°C. *Journal of IMAB - Annual Proceeding (Scientific Papers)*, 27(4), 4038–4042. <https://doi.org/10.5272/jimab.2021274.4038>
- Etter, D., Corti, S., Spirig, S., Cernela, N., Stephan, R., & Johler, S. (2020). *Staphylococcus aureus* Population Structure and Genomic Profiles in Asymptomatic Carriers in Switzerland. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01289>
- Francisco, A., Bugalho, M., Ramirez, M., & Carriço, J. A. (2009). Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 152. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-152>
- Fuda, C., Suvorov, M., Vakulenko, S. B., & Mobashery, S. (2004). The Basis for Resistance to β -Lactam Antibiotics by Penicillin-binding Protein 2a of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39), 40802–40806. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403589200>
- Gabryszewski, S. J., Wong Fok Lung, T., Annavajhala, M. K., Tomlinson, K. L., Riquelme, S. A., Khan, I. N., Noguera, L. P., Wickersham, M., Zhao, A., Mulenos, A. M., Peaper, D., Koff, J. L., Uhlemann, A.-C., & Prince, A. (2019). Metabolic Adaptation in Methicillin-

Resistant *Staphylococcus aureus* Pneumonia. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 61(2), 185–197. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0389OC>

- García, A. (2019). *Tipificación molecular de Mannheimia haemolytica y Pasteurella multocida asociadas a la pasteurelosis neumónica ovina*. [Tesis de Doctorado, Universidad Complutense de Madrid].
<https://eprints.ucm.es/id/eprint/55089/1/T41037.pdf>
- Gnanamani, A., Hariharan, P., & Paul-Satyaseela, M. (2017). *Staphylococcus aureus*: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach. In *Frontiers in Staphylococcus aureus*. InTech.
<https://doi.org/10.5772/67338>
- Goudarzi, M., Seyedjavadi, S. S., Nasiri, M. J., Goudarzi, H., Sajadi Nia, R., & Dabiri, H. (2017). Molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from patients with bacteremia based on MLST, SCCmec, spa, and agr locus types analysis. *Microbial Pathogenesis*, 104, 328–335.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.055>
- Gould, D., & Chamberlaine, A. (1995). *Staphylococcus aureus*: a review of the literature. *Journal of Clinical Nursing*, 4(1), 5–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2702.1995.tb00004.x>
- Guo, N., Wei, Q., & Xu, Y. (2020). Optimization of cryopreservation of pathogenic microbial strains. *Journal of Biosafety and Biosecurity*, 2(2), 66–70.
<https://doi.org/10.1016/j.jobbb.2020.11.003>
- Haney, J. (2005). *Staphylococcus aureus*. <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=10046>
- Hashemizadeh, Z., Bazargani, A., Kalantar-Neyestanaki, D., Mohebi, S., & Hadi, N. (2020). Determining spa-type of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) via high-resolution melting (HRM) analysis, Shiraz, Iran. *BMC Research Notes*, 13(1), 97.
<https://doi.org/10.1186/s13104-020-04948-z>
- He, Y., Xie, Y., & Reed, S. (2014). *Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Staphylococcus aureus Isolates* (pp. 103–111). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-664-1_6
- Hoegh, S. v., Skov, M. N., Boye, K., Worning, P., Jensen, T. G., & Kemp, M. (2014). Variations in the *Staphylococcus aureus*-specific nuc gene can potentially lead to misidentification of methicillin-susceptible and -resistant *S. aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 63(7), 1020–1022. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.076638-0>
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2013). Vigilancia de *Staphylococcus aureus* metilicina resistente adquirido en la comunidad. Chile, 2007 – 2012. *Boletín ISP*, 3(7), 1–21.
[https://www.ispch.cl/sites/default/files/BoletinStahylococcusResistente-20062018A%20\(1\).pdf](https://www.ispch.cl/sites/default/files/BoletinStahylococcusResistente-20062018A%20(1).pdf)

- Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública. (16 de noviembre de 2019). *Resistencia Antimicrobiana*. https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf
- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. (23 de septiembre de 2012). *Staphylococcus aureus*. <https://www.insst.es/documents/94886/353495/Staphylococcus+aureus.pdf/0f7074f1-f1d4-441e-b808-edd4523c9fae?version=1.0&t=1528734434245>
- Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Research*, 3, 124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
- Katayama, Y., Ito, T., & Hiramatsu, K. (2000). A New Class of Genetic Element, *Staphylococcus* Cassette Chromosome *mec*, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6), 1549–1555. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.6.1549-1555.2000>
- Kavanagh, K. T. (2019). Control of MSSA and MRSA in the United States: protocols, policies, risk adjustment and excuses. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0550-2>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Khan, N., Ahsan, M., Yoshizawa, S., Hosoya, S., Yokota, A., & Kogure, K. (2008). Multilocus Sequence Typing and Phylogenetic Analyses of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from the Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(20), 6194–6205. <https://doi.org/10.1128/AEM.02322-07>
- Kim, G.-L., Hooven, T. A., Norambuena, J., Li, B., Boyd, J. M., Yang, J. H., & Parker, D. (2021). Growth and Stress Tolerance Comprise Independent Metabolic Strategies Critical for *Staphylococcus aureus* Infection. *MBio*, 12(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00814-21>
- Kong, C., Neoh, H., & Nathan, S. (2016). Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. *Toxins*, 8(3), 72. <https://doi.org/10.3390/toxins8030072>
- Lakhundi, S., & Zhang, K. (2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. In *Clinical microbiology reviews* (Vol. 31, Issue 4). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>

- Lee, A. S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., & Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers*, 4. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
- Life Technologies Corporation. (2011). *PureLink® PCR Purification Kit For rapid, efficient purification of PCR products Catalog numbers K3100-01 and K3100-02*. https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink_pcr_man.pdf?ga=2.130614344.690066872.1639688301-1651989391.1639688301
- Liu, D. (2015). Enterotoxin-Producing *Staphylococcus aureus*. In *Molecular Medical Microbiology* (pp. 979–995). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00055-X>
- Missiakas, D. M., & Schneewind, O. (2013). Growth and Laboratory Maintenance of *Staphylococcus aureus*. In *Current Protocols in Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc09c01s28>
- Monteiro, A. de S., Pinto, B. L. S., Monteiro, J. de M., Ferreira, R. M., Ribeiro, P. C. S., Bando, S. Y., Marques, S. G., Silva, L. C. N., Neto, W. R. N., Ferreira, G. F., Bomfim, M. R. Q., & Abreu, A. G. (2019). Phylogenetic and Molecular Profile of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bloodstream Infections in Northeast Brazil. *Microorganisms*, 7(7), 210. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7070210>
- Nemoy, L. L., Kotetishvili, M., Tigno, J., Keefer-Norris, A., Harris, A. D., Perencevich, E. N., Johnson, J. A., Torpey, D., Sulakvelidze, A., Morris, J. G., & Stine, O. C. (2005). Multilocus Sequence Typing versus Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4), 1776–1781. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1776-1781.2005>
- Noboa, K. (2020). *Estudio de expresión génica de factores de virulencia de aislados clínicos de Staphylococcus aureus causantes de bacteremia*. [Tesis de Grado, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/22528>
- Onyango, L. A., Dunstan, R. H., Gottfries, J., von Eiff, C., & Roberts, T. K. (2012). Effect of Low Temperature on Growth and Ultra-Structure of *Staphylococcus* spp. *PLoS ONE*, 7(1), e29031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029031>
- Oogai, Y., Matsuo, M., Hashimoto, M., Kato, F., Sugai, M., & Komatsuzawa, H. (2011). Expression of Virulence Factors by *Staphylococcus aureus* Grown in Serum. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 8097–8105. <https://doi.org/10.1128/AEM.05316-11>
- Organización Mundial de la Salud. (13 de octubre de 2020). *Resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

- O’Riordan, W., McManus, A., Teras, J., Poromanski, I., Cruz-Saldariagga, M., Quintas, M., Lawrence, L., Liang, S., Cammarata, S., Chaparro, G. J., Frassone, N. E., Morera, G., de Faria Freire, A. T., Stobbe, J. C., Dimov, R. S., Ninov, B. T., Poromanski, I., Rusev, P., Simeonov, S., ... Hoppers, M. (2018). A Comparison of the Efficacy and Safety of Intravenous Followed by Oral Delafloxacin With Vancomycin Plus Aztreonam for the Treatment of Acute Bacterial Skin and Skin Structure Infections: A Phase 3, Multinational, Double-Blind, Randomized Study. *Clinical Infectious Diseases*, 67(5), 657–666. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy165>
- Otto, M. (2014). *Staphylococcus aureus* toxins. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 17, Issue 1, pp. 32–37). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.11.004>
- Page, A. J., Alikhan, N.-F., Carleton, H. A., Seemann, T., Keane, J. A., & Katz, L. S. (2017). Comparison of classical multi-locus sequence typing software for next-generation sequencing data. *Microbial Genomics*, 3(8). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000124>
- Pasachova, J., Ramirez, S., & Muñoz, L. (2019). *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *NOVA*, 17(32), 25–38.
- Pattengale, N. D., Alipour, M., Bininda-Emonds, O. R. P., Moret, B. M. E., & Stamatakis, A. (2010). How Many Bootstrap Replicates Are Necessary? *Journal of Computational Biology*, 17(3), 337–354. <https://doi.org/10.1089/cmb.2009.0179>
- Pérez-Losada, M., Arenas, M., & Castro-Nallar, E. (2017). Multilocus Sequence Typing of Pathogens. In *Genetics and Evolution of Infectious Diseases* (pp. 383–404). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799942-5.00016-0>
- Polveiro, R. C., Granja, M. M. C., Roldão, T. C. B., da Silva Lopes, I., Vidigal, P. M. P., Lima, M. C., & Moreira, M. A. S. (2021). Multilocus sequence analysis reveals genetic diversity in *Staphylococcus aureus* isolate of goat with mastitis persistent after treatment with enrofloxacin. *Scientific Reports*, 11(1), 17252. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96764-z>
- Postma, B., Poppelier, M. J., van Galen, J. C., Prossnitz, E. R., van Strijp, J. A. G., de Haas, C. J. C., & van Kessel, K. P. M. (2004). Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus* Binds Specifically to the C5a and Formylated Peptide Receptor. *The Journal of Immunology*, 172(11), 6994–7001. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.11.6994>
- Preeja, P. P., Kumar, S. H., & Shetty, V. (2021). Prevalence and Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Community- and Hospital-Associated Infections: A Tertiary Care Center Study. *Antibiotics*, 10(2), 197. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020197>
- Promega. (2018). *GoTaq Flexi DNA Polymerase*. https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-flexi-dna-polymerase-m829.pdf?rev=f4d69130c5f7402898bc2116cc0e3584&sc_lang=en

- Public Health England, & National Health Service. (2020). Identification of *Staphylococcus* species, *Micrococcus* species and *Rothia* species. *UK Standards for Microbiology Investigations*, 7(4), 1–26.
- Reyes, J., Rincón, S., Diaz, L., Panesso, D., Contreras, G. A., Zurita, J., Carrillo, C., Rizzi, A., Guzman, M., Adachi, J., Chowdhury, S., Murray, B. E., & Arias, C. A. (2009). Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 sequence type 8 lineage in Latin America. *Clinical Infectious Diseases*, 49(12), 1861–1867. <https://doi.org/10.1086/648426>
- Rodríguez, E., Seas, C., Guzmán-Blanco, M., Mejía, C., Alvarez, C., Bavestrello, L., Zurita, J., Labarca, J., Luna, C. M., Salles, M. J. C., & Gotuzzo, E. (2010). Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. In *International Journal of Infectious Diseases* (Vol. 14, Issue 7). <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.08.018>
- Rodríguez, F., Fernández, S., Haim, S., Mollerach, M., Basualdo, W., Castro, H., Quiñónez †, B., & Guillén-Fretes, R. M. (2017). Estandarización del análisis multi-locus de número variable de repeticiones en tándem para el estudio de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina aislados de la comunidad en Paraguay. *Duazary*, 14(2), 131. <https://doi.org/10.21676/2389783X.1971>
- Sabat, A. J., Budimir, A., Nashev, D., Sá-Leão, R., van Dijl, J. M., Laurent, F., Grundmann, H., Friedrich, A. W., & on behalf of the ESCMID Study Group. (2013). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Eurosurveillance*, 18(4). <https://doi.org/10.2807/ese.18.04.20380-en>
- Salazar, M. J., Machado, H., Dillon, N. A., Tsunemoto, H., Szubin, R., Dahesh, S., Pogliano, J., Sakoulas, G., Palsson, B. O., Nizet, V., & Feist, A. M. (2020). Genetic Determinants Enabling Medium-Dependent Adaptation to Nafcillin in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *MSystems*, 5(2). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00828-19>
- Saunders, N. A., & Holmes, A. (2014). Multilocus sequence typing (MLST) of *Staphylococcus aureus*. *Methods in Molecular Biology*, 1085, 113–130. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-664-1_7
- Silva, V., Hermenegildo, S., Ferreira, C., Manaia, C. M., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Carvalho, I., Pereira, J. E., Maltez, L., Capelo, J. L., Igrejas, G., & Poeta, P. (2020). Genetic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from human bloodstream infections: Detection of MLSB resistance. *Antibiotics*, 9(7), 1–9. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9070375>
- Sit, P. S., Teh, C. S. J., Idris, N., Sam, I. C., Syed Omar, S. F., Sulaiman, H., Thong, K. L., Kamarulzaman, A., & Ponnampalavanar, S. (2017). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection and the molecular characteristics of MRSA bacteraemia over a two-year period in a tertiary teaching hospital in Malaysia. *BMC Infectious Diseases*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2384-y>

- Strauß, L., Stegger, M., Akpaka, P. E., Alabi, A., Breurec, S., Coombs, G., Egyir, B., Larsen, A. R., Laurent, F., Monecke, S., Peters, G., Skov, R., Strommenger, B., Vandenesch, F., Schaumburg, F., & Mellmann, A. (2017). Origin, evolution, and global transmission of community-acquired *Staphylococcus aureus* ST8. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(49), E10596–E10604. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702472114>
- Sune, D., Rydberg, H., Augustinsson, Å. N., Serrander, L., & Jungeström, M. B. (2020). Optimization of 16S rRNA gene analysis for use in the diagnostic clinical microbiology service. *Journal of Microbiological Methods*, *170*, 105854. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105854>
- Suo, B., Yang, H., Wang, Y., Lv, H., Li, Z., Xu, C., & Ai, Z. (2018). Comparative Proteomic and Morphological Change Analyses of *Staphylococcus aureus* During Resuscitation From Prolonged Freezing. *Frontiers in Microbiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00866>
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, *28*(10), 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Tankeshwar, A. (30 de mayo de 2021). *Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE): Steps, Applications*. Microbe Online. <https://microbeonline.com/pulsed-field-gel-electrophoresis-pfge/>
- Tardón, L. (22 de abril de 2014). *Preocupación por las bacterias multirresistentes*. <https://www.elmundo.es/salud/2014/04/22/535515a3ca47413d2a8b4577.html>
- Tomatis, C., Baroni, M. R., Mendosa, M. A., Nagel, A., Mollerach, A., Alvarez, C., Zurbriggen, M. L., Cristobal, S., Segovia, G., & Méndez, E. de los A. (2018). Tipos de spa no reportados en nuestro país en *Staphylococcus aureus* de pacientes adultos de un hospital escuela, Santa Fe, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, *50*(3), 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.09.001>
- Tsouklidis, N., Kumar, R., Heindl, S. E., Soni, R., & Khan, S. (2020). Understanding the Fight Against Resistance: Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* vs. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.8867>
- Turista, D. D. R., & Puspitasari, E. (2019). The Growth of *Staphylococcus aureus* in the blood agar plate media of sheep blood and human blood groups A, B, AB, and O. *Jurnal Teknologi Laboratorium*, *8*(1), 1–7. <https://doi.org/10.29238/teknolabjournal.v8i1.155>
- Turner, N. A., Sharma-Kuinkel, B. K., Maskarinec, S. A., Eichenberger, E. M., Shah, P. P., Carugati, M., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. In *Nature Reviews*

Microbiology (Vol. 17, Issue 4, pp. 203–218). Nature Publishing Group.
<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4>

- Vaca, S., Cruz, S., & Iñiguez Samuel. (2021). Prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en el personal de salud de un Hospital de Especialidades en Quito-Ecuador. *Revista San Gregorio*, 1(45), 86–98.
- Van Kessel, K. P. M., Bestebroer, J., & van Strijp, J. A. G. (2014). Neutrophil-Mediated Phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Immunology*, 5.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00467>
- Vazquez, V., Liang, X., Horndahl, J. K., Ganesh, V. K., Smeds, E., Foster, T. J., & Hook, M. (2011). Fibrinogen Is a Ligand for the *Staphylococcus aureus* Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMM) Bone Sialoprotein-binding Protein (Bbp). *Journal of Biological Chemistry*, 286(34), 29797–29805.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.214981>
- Wang, X. (2020). Spa Typing of *Staphylococcus aureus* Isolates. In Y. Ji (Ed.), *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2069, pp. 89–94). Springer Science.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9849-4_6
- Willner, D., Daly, J., Whiley, D., Grimwood, K., Wainwright, C. E., & Hugenholtz, P. (2012). Comparison of DNA Extraction Methods for Microbial Community Profiling with an Application to Pediatric Bronchoalveolar Lavage Samples. *PLoS ONE*, 7(4), e34605.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034605>
- Yeung, E. Y. H., & Gorn, I. (2021). Use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis to Determine the Source of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Infectious Disease Reports*, 13(3), 602–610. <https://doi.org/10.3390/idr13030056>
- Zurita, J., Barba, P., Ortega-Paredes, D., Mora, M., & Rivadeneira, S. (2016). Local circulating clones of *Staphylococcus aureus* in Ecuador. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 20(6), 525–533. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.08.006>

